

IMPULZUS LÉZERES ANYAGÁTVITELI TECHNIKÁK AZ ANYAGTUDOMÁNYBAN ÉS A BIOLÓGIÁBAN

MTA Doktori Értekezés

Dr. Hopp Béla
/tudományos főmunkatárs/

MTA Lézerfizikai Tanszéki Kutatócsoport
Szegedi Tudományegyetem
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Szeged

2007

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	4
I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
I.1. Az abláció	6
I.2. PLD	8
I.3. MAPLE.....	11
I.4. LIFT	12
II. A VIZSGÁLT CÉLANYAGOK	15
II.1. Teflon	15
II.2. Biopolimerek	18
II.3. Pepszin.....	21
II.4. Ureáz.....	23
II.5. Sejtmegtapadást elősegítő anyagok	24
III. CÉLKITŰZÉS	26
IV. EREDMÉNYEK	28
IV.1. Biokompatibilis és biológiai vékonyrétegek előállítása impulzuslézeres vékonyréteg leválasztással.....	28
IV.1.1. Az alkalmazott kísérleti elrendezés (PLD-kamra).....	28
IV.1.2. Szervezetbarát Teflon védőrétegek leválasztása allergén tárgyak felületére	29
IV.1.3. Polihidroxibutirát vékonyrétegek impulzuslézeres leválasztása	43
IV.1.4. Pepszin vékonyréteg előállítása.....	45
IV.1.5. Ureáz vékonyréteg készítése MAPLE és PLD technikákkal, a két módszer összehasonlítása.....	48
IV.1.6. „Fog-vékonyréteg” előállítása impulzuslézeres vékonyréteg építéssel.....	60
IV.1.7. Biológiai vékonyrétegek femtoszekundumos PLD-je.....	66
IV.1.8. Irányított sejtnövekedés, sejtsztruktúrák megvalósítása PLD-vel.....	70
IV.2. Biológiai objektumok abszorbeáló réteggel elősegített kontrollált nano- és femtoszekundumos lézeres mozgatása, átvitele	74
IV.2.1. AFA-LIFT	74
IV.2.2. Trichoderma spórák lézeres átvitele	76
IV.2.3. Élő sejtek lézeres átvitele	79
IV.2.4. Az anyagátviteli folyamatok időfelbontásos vizsgálata	82

IV.2.5. Átlátszó anyagok lézerindukált hátsóoldali száraz maratása.....	88
V. ÖSSZEFOGLALÁS	100
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108
HIVATKOZÁSOK.....	109

BEVEZETÉS

A lézerek kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően az utóbbi évtizedekben több lézeres technikát, szerszámot, anyagmegmunkálási, diagnosztikai, analitikai módszert dolgoztak ki, melyek közül sokat már évek óta sikerrel alkalmaznak is az ipar és az orvostudomány számos ágában. Napjainkban a lézerek bioszenzor-technikai, biológiai és orvosi célú alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata vált az egyik legdinamikusabban fejlődő kutatási területté, melyre fokozottan igaz az interdiszciplináris jelző. Itt a jelenségek értelmezéséhez, megértéséhez, az elért eredmények felhasználásához elengedhetetlenül szükséges a megfelelő fizikai, kémiai, biológiai, orvosi szakterület minél jobb ismerete, a témán dolgozó különböző kutatócsoportok szoros együttműködése. Fizikusként természetesen az általam tanulmányozott részterület fizikai aspektusait, lehetőségeit, jellemzőit vizsgáltam kutatómunkám során.

A dolgozatomban bemutatott kísérletek, eredmények két fő témakör köré csoportosulnak. Az első a **biológiai, biokompatibilis vékonyrétegek impulzuslézeres leválasztása**. Az elsősorban szupravezető vékonyrétegek előállítására kifejlesztett technikát (*Pulsed Laser Deposition, PLD*) egyre szélesebb körben használják ma már szerves vékonyrétegek laboratóriumi előállítására is, mivel az ilyen vékonyrétegekkel szemben támasztott egyre szigorúbb követelmények (a folyamatok jobb kontrollálhatósága, speciális mintázatok készítése, több anyagból álló vékonyréteg mátrixok létrehozása, mikrométeres feloldás, stb.) egyre vonzóbbá teszik a lézereken alapuló technikákat a hagyományos eljárásokkal szemben. Az előzetes vizsgálatok mára már bebizonyították, hogy a polimer és biológiai, biokompatibilis vékonyrétegek széles körben alkalmazhatók a gyógyszerészet, sebészet, implantológia, elektronika, bioszenzor gyártás és biomérnöki tudomány területén. Különböző típusú biomolekulák és organizmusok kimutathatók olyan vékonyréteg bioszenzorok segítségével, melyek alapja valamilyen enzim, enzimet tartalmazó szövet, antitest, nukleinsav, stb., amely szelektíven reagál a detektálni kívánt anyagra. Több típusú szenzor mátrixba építésével komplex szenzor csipek készíthetők.

A másik kutatási témám az általam, más kutatócsoportokkal egyidejűleg, de tőlük függetlenül kifejlesztett eljárásnak, a **biológiai minták abszorbeáló réteggel elősegített előreirányuló lézeres átvitelének** (*Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer, AFA-LIFT*) a vizsgálata. Ennek során egy nagy abszorpciójú vékonyréteggel bevont átlátszó hordozóra (donor) felvitt sérülékeny biológiai anyag a hordozón keresztül történő

lézeres besugárzással átvihető a vele szemben, tőle kis távolságra elhelyezett szubsztrátra (akceptor). Ez a módszer lehetővé teszi érzékeny biológiai anyagokból és organizmusokból álló mátrixok, háromdimenziós struktúrák előállítását is. Ezek fontos szerepet játszhatnak élő sejt, illetve szövet alapú érzékelő eszközök kifejlesztésében, valamint a hatalmas lehetőségek előtt álló szövetépítésben, mely lehetővé teszi sérült szövetek, biológiai funkciók gyorsabb helyreállítását, regenerálódását, vagy a távolabbi jövőben akár teljes élő, adott típusú szövetek létrehozását.

A kapcsolat a két téma között, hogy tulajdonképpen mindkét módszerben lézer impulzusok energiáját használjuk anyagátvitelre. Az első esetben egy vákuumban elhelyezett céltárgyból nagyenergiájú impulzusok hatására eltávozó anyagmennyiség rakódik le vékonyréteggént egy szubsztráton, a másodikban a normál atmoszférán levő hordozón elhelyezett néhány köbmikrométernyi anyagmennyiség megy át egy jóval kisebb energiájú impulzus hatására a tőle kis távolságra (általában <1 mm) elhelyezkedő másik felületre jól kontrollálható módon.

Dolgozatom első részében röviden bemutatom a munkám során alkalmazott főbb módszereket, eljárásokat és a felhasznált célanyagokat. Ezután ismertetem egy biokompatibilis polimer, a Teflon, két biopolimer, a polihidroxi-butirát és a poliglikolsav vékonyréteg előállítása terén elért eredményeimet, a szervezetbarát „fog-vékonyrétegek” leválasztására, valamint enzimekből, pepszimből és ureázból történő vékonyréteg növesztésére tett kísérleteimet és azok eredményeit. Itt találhatók még az irányított sejtnövekedést elősegítő vékonyrétegépítési vizsgálataim is.

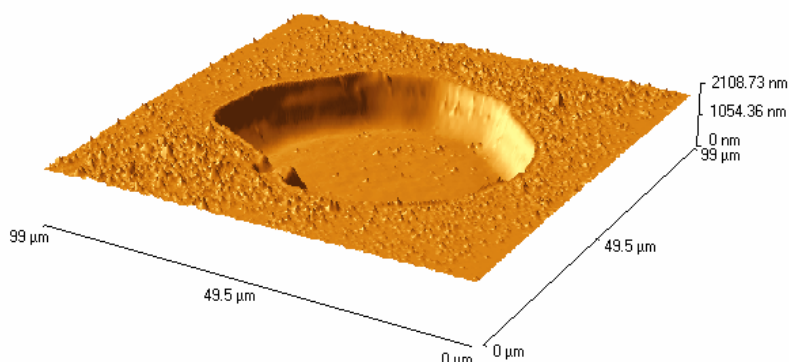
A második rész tartalmazza a kifejlesztett lézeres átviteli eljárás leírását, egy Trichoderma gombatörzs spórái és különböző típusú élő sejtek abszorbeáló réteggel elősegített lézeres átvitele terén végzett kutatásaimat. Ezek során sikerült a sérülékeny biológiai objektumokat kontrolláltan átmozgatnom úgy, hogy nagy többségük megőrizte élet- és szaporodóképességét. Itt ismertetem az átvitel folyamatának feltérképezésére végzett időfelbontásos kísérleteimet, melyekben egy lézeres gyorsfényképező elrendezés segítségével meghatároztam az átrepülő részecskék sebességét, becslést adtam gyorsulásukra, kidolgoztam egy modellt az átviteli folyamatok leírására. Itt mutatom még be az eljárás vizsgálata során felfedezett kísérő jelenséget, s annak vizsgálatát, melyen alapuló lézerindukált hátsóoldali száraz maratási eljárást azóta le is szabadalmaztattuk.

I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Kutatómunkám során különböző biokompatibilis és biológiai anyagokból állítottam elő vékonyrétegeket impulzuslézeres leválasztási módszerekkel (PLD, MAPLE), illetve biológiai anyagok lézeres átvitelét (AFA-LIFT) vizsgáltam. Ennek megfelelően ebben a fejezetben röviden ismertetem, milyen tudományos és technikai előzmények szolgáltak az általam elért eredmények alapjául.

I.1. Az abláció

Egy nagyteljesítményű impulzuslézer nyalábját a céltárgyra fókuszálva, a besugárzás hatására a felületre merőlegesen plazmaállapotú anyagfelhő lép ki. Ezt a jelenséget ablációnak nevezzük. A mikroszkópos megfigyelések azt mutatták, hogy az így kapott maratási gödör tiszta, meredek falú, éles peremű (I.1. ábra).



I.1. ábra Polimetil-metakrilátba ablált gödör atomi erő mikroszkópos képe

Az abláció egy meglehetősen komplex folyamat, mely egyaránt függ az alkalmazott lézer paramétereitől (hullámhossz, energiasűrűség, impulzushossz) és a céltárgy optikai, termikus és morfológiai tulajdonságaitól. A folyamat jellemezhető egy F_k küszöb-energiasűrűséggel, amely alatt az abláció nem következik be az első impulzus hatására. Ez a küszöb-energiasűrűség legfőképpen a mintának az alkalmazott lézer hullámhosszán mért abszorpciós együtthatójától (α) függ [1-4].

A különböző vizsgálatok azt mutatták, hogy az ablációs maratási sebességre (l :=maratási mélység/impulzusszám) közelítőleg teljesül a következő összefüggés:

$$l = \frac{I}{\alpha} \ln \left(\frac{F}{F_k} \right),$$

ahol F az alkalmazott energiasűrűség. Hamar kiderült azonban, hogy ez a viszony nem áll fenn nagyobb (néhány J/cm^2) energiasűrűség értékek esetén, eltér a logaritmikustól, sőt sok esetben lineárisra válik, $I \propto (F - F_0)$, ahol F_0 egy jellemző érték, többnyire nem azonos F_K -val. Néhány anyag esetében a maratási sebesség állandóvá válik elegendően nagy energiasűrűségek alkalmazása esetén [5]. Gorodetsky és munkatársai azt is kimutatták, hogy a maratás során a lézersugár abszorpciója a céltárgy hőmérsékletének növekedését okozza. F_K alatt ez arányos az F -fel, felette pedig az F növekedésénél lassabban nő [6].

Az abláció felfedezése óta eltelt években számos, egymásnak gyakran ellentmondó elmélet született a folyamat leírására. Ezek közül az első jelentősebb az ún. fotokémiai modell. Eszerint egy UV foton beesve a minta felületére, nagy energiájának egy része révén képes kémiai kötés felszakítására az abszorbeáló molekulában, míg energiájának másik részével a szétszakított részek kinetikai energiáját növeli meg, ami az anyag gyors fotodekompozíciójához vezet [7].

Azonban a részletesebb vizsgálatok bebizonyították, hogy abláció nemcsak UV lézerekkel érhető el, hanem látható, sőt infravörös lézerekkel is [8]. Mindezen tényeket nem lehetett értelmezni a fenti modellel. Szükségessé vált tehát egy komplexebb ablációs elmélet kidolgozása. Ezt nevezik fototermális modellnek. Eszerint különösen hosszabb hullámhosszúságú besugárzó lézerek esetén az anyag fotonabszorpció okozta gerjesztése közvetlenül nem okoz kémiai kötés felszakítást, hanem gyors felmelegedést eredményez, melynek következtében a besugárzott terület robbanásszerűen elpárolog [9]. Ekkor az ablációs mechanizmus két fő részre bontható: 1; abszorpcióra, 2; termális bomlásra és diffúzióra. A kísérleti megfigyelések valóban azt bizonyították, hogy a tényleges abláció a lézerimpulzus után jóval később indul meg: a felület optikai tulajdonságainak tranziens megváltozása az első jele a fizikai változások bekövetkeztének [10], ezt követi a lökéshullám megjelenése [11-12], majd elkezdődik az anyageltávozás, megjelenik a plume kb. $1 \mu\text{s}$ -mal a besugárzás után [13]. Ez időben sokkal tovább tart, mint az abláló impulzus hossza. Ezt a két modellt ([5], [9]) együttesen alkalmazva, igen jól le lehet írni az ablációs mechanizmust.

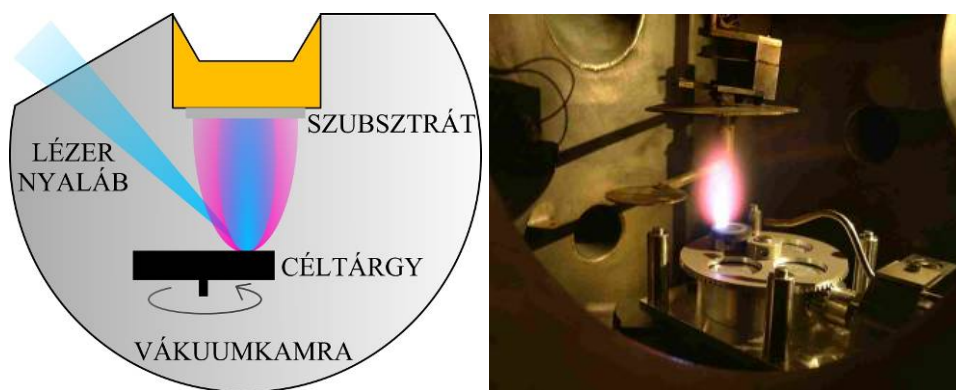
A viszonylag alacsony abszorpciós tényezővel rendelkező polimereknél egy speciális effektust figyeltek meg: az anyageltávozás a küszöb-energiásűrűség alatt is megindul egy jól meghatározott impulzusszám után. Ez a szám függ a minta anyagi jellemzőitől és az alkalmazott lézer impulzus paramétereitől. Ezt a jelenséget inkubációnak nevezik [14-18]. Ez a következőképpen magyarázható: egy lézer impulzus beesve a viszonylag kis abszorpciós tényezővel rendelkező minta felületére abláció mentes kötés felbomlásokat okoz, melyek együttjárhatnak a besugárzott terület néhány optikai tulajdonságának megváltozásával, például

eredményezheti az abszorpciós tényező növekedését. Ennek következménye, hogy az F_k értéke lecsökken. Egy lövéssorozat során bekövetkezhet az az eset, hogy a küszöb-energiasűrűség annyira lecsökken, hogy egy adott impulzusszám után megkezdődik az abláció, megindul az anyageltávozás.

Az ablációs anyagfelhő atomok, molekulák, ionok, mikron méretű szilárd törmelékek és olvadt cseppek egyvelege, mely a belsejében uralkodó magas nyomás következtében nagy sebességgel terjed ki, erős, a felületre merőleges irányítottságot mutatva [19-21]. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a besugárzó impulzushoz képest nanoszekundumos tartományban kibocsátott atomi és molekuláris méretű részecskék eltávozási sebessége a céltárgy anyagától és az alkalmazott lézer energiasűrűségétől függően akár a 10^3 - 10^4 m/s-ot is elérheti. Az anyagfelhő irány szerinti eloszlása $\cos^n(\theta)$ függvényvel írható le, ahol θ a felület normálisával bezárt szög, n pedig az anyagfelhő gáz-dinamikai tulajdonságaitól függő paraméter [22]. Az előbbiektől 1-2 nagyságrenddel kisebb sebességgel távoznak a mikroszekundumos tartományban kibocsátott nagyobb méretű cseppek, törmelékek. Amennyiben az abláció nem vákuumban megy végbe, a hirtelen kitáguló anyagfelhő lökéshullámot hoz létre [23-26]. Az eltávozó plazma árnyékoló és szóró hatása gyengítheti a felületre beeső lézerintenzitást, lerontva ezzel az abláció hatásfokát [27,28]. A tömegspektroszkópiai mérések bebizonyították, hogy az ablációs maratásnak számos molekuláris terméke van, melyek összetétele, száma függ a minta anyagától, kémiai összetételétől, a besugárzó lézer hullámhosszától és az energiasűrűségtől [29]. Pl. polimetilmetakrilát (PMMA) ArF-os ablációja során többségében MMA monomereket figyeltek meg, míg KrF abláló lézer alkalmazása esetén ezek száma jóval kevesebb volt a nagyobb polimer fragmentumokhoz képest [30]. Biológiai minták maratásakor még kisebb (néhány atomos) molekulák keletkeznek, mint például H_2 , CO , CO_2 , CH_4 , C_2H_4 [31].

I.2. PLD

Az abláció során eltávozó nagysebességű anyagfelhő felfogható egy, az útjába helyezett szubsztráton, ahol megfelelő körülmények esetén vékonyréteggént rakódik le. A vékonyréteg növesztésének ezt a viszonylag egyszerű módját impulzuslézeres vékonyréteg leválasztásnak (Pulsed Laser Deposition, PLD) nevezik. Az ehhez szükséges kísérleti elrendezés elvi vázlatát és annak gyakorlati megvalósítását az I.2. ábra mutatja be.



I.2. ábra Az impulzuslézeres vékonyréteg leválasztáshoz alkalmazott elrendezés elvi vázlata és fényképe.

A berendezés egy vákuumkamrában elhelyezett céltárgyból és szubsztrátból áll. A folyamat általában vákuumban megy végbe, de a módszer alkalmas vékonyréteg építésre reaktív gázok jelenlétében is. Ez sokoldalú felhasználási lehetőséget biztosít a technológiának, mivel nincs szükség aktív elektromos alkatrészekre (pl. kisülési elektródák), ezért többféle reaktív gáz alkalmazható. Emellett az ablációs anyagfelhő gerjesztett atomjai könnyen reakcióba lépnek a gázkörnyezet molekuláival.

Az első nagyteljesítményű rubin-lézerek megépítése után lehetőség nyílt kísérletileg és elméletileg is tanulmányozni az intenzív lézer nyaláb kölcsönhatását szilárd testekkel [32,33] és folyadékokkal [34]. Az első ablációs kísérletet Breech és Cross végezte 1962-ben, rubin lézert alkalmazva szilárd test párologtatására elem-analízis céljából [35]. Mivel bizonyos anyagok könnyen párologtak lézeres besugárzás hatására, felmerült annak lehetősége, hogy a nagy intenzitású lézeres besugárzás alkalmas lehet vékonyrétegek készítésére. A módszer alkalmazhatóságát néhány évvel később Smith és Turner bizonyította be vékonyréteget növesztve félvezetőkre, dielektrikumokra és fémorganikus anyagok felületére [36]. A reaktív gázkörnyezetben történő vékonyréteg építést először Gapanov valósította meg oxidok leválasztásával oxidatív környezetben [37], nem sokkal ezután Oesterreicher hibrid rétegeket növesztett hidrogén atmoszférában [38]. A 80-as évek végéig kevés publikáció jelent meg a PLD-vel kapcsolatosan. Ekkor következett be a második, jelentősebb áttörés a magas kritikus hőmérsékletű szupravezetők PLD-vel történő előállításával [39,40]. Ezen sikerek után egyre több csoport kapcsolódott be PLD-vel kapcsolatos kutatásokba és a témával foglalkozó publikációk száma is robbanásszerűen megnőtt. Egy 1991-ben készített összesítés 128 PLD-vel növesztett anyagról számol be [41]. 1994-re ezen anyagok száma már meghaladta 180-at [42] és azután is tovább növekedett. A leválasztott anyagok között voltak fémek, oxidok,

nitridek, egyszerű szerkezetű szerves anyagok, kerámiák és magas kritikus hőmérsékletű szupravezetők.

A módszer előnyei, hogy, amennyiben ez a cél, megfelelő leválasztási paraméterek mellett az anyag átlagos sztöchiometriája a folyamat során megmarad, az anyagfelhő nagy kinetikus energiája következtében tömör vékonyréteg hozható létre, egyidejűleg többféle céltárgy anyagot alkalmazva, kevert rétegek is előállíthatók, és az egy impulzussal épített réteg vékonysága miatt (az átlagos rétegvastagság kisebb is lehet, mint egy atomi réteg) jól meghatározott vastagságú film választható le. A PLD technológia nagy előnye még, hogy számos paraméter széles tartományban változtatható (pl. a nyomás, a lézer energiasűrűsége, a kísérlet atmoszférájának összetétele, vagy a céltárgy, illetve a szubsztrát hőmérséklete), így nagyszámú információ nyerhető mind a rétegek kialakulásának folyamatáról, mind pedig adott anyagok leválasztásának ideális körülményeit illetően. Előnyei mellett azonban hátrányai is vannak, mint például a mikron méretű szilárd törmelékek és cseppek megjelenése a vékonyrétegen, és hogy az anyagfelhő kis szórási szöge miatt csak viszonylag kis területű homogén vékonyréteget lehet létrehozni. Amennyiben érdes rétegek előállítása a cél, a mikronméretű szemcsék jelenléte akár előnyt is jelenthet.

Szerves vékonyrétegek előállításának története már a legelső impulzuslézeres vékonyréteg építési kísérletek idejére visszanyúlik: Smith és Turner fukszin (egy szerves festék) és Ni-dimetil-glioxim (egy festékekben, kozmetikumokban alkalmazott pigment) vékonyrétegek előállítására tettek kísérletet [43]. A korai vizsgálatok ellenére több mint két évtizedig jelentősebb eredmény nem született a témában. A szerves vékonyrétegek (ezek közül is főként az optoelektronikai szempontból lényeges fotolumineszcens anyagok) PLD-vel történő előállítása a 90-es években lett szélesebb körben elterjedt kutatási téma. Elektrolumineszcens anyagok vékonyréteggént való előállítása szerves fény-emittáló diódák gyártása szempontjából jelentős. A módszer alkalmazását ilyen vékonyrétegek elkészítésére nehezíti, hogy a nagy méretű, összetett molekulákban irreverzibilis kötésfelszakadások következhetnek be az intenzív lézeres besugárzás hatására. Általában véve ablációs küszöb feletti energiasűrűségeknél a leválasztott anyag molekulaszervezete nem áll tökéletesen helyre. Azonban Matsumoto és munkatársai kimutatták, hogy szerves elektrolumineszcens anyagok PLD-je ablációs küszöbhez közeli energiasűrűségekkal megvalósítható. KrF excimer lézert alkalmazva sikeresen állítottak elő amorf réz-ftalocianin (CuPc) és 4-dialkilamino-4-nitrozilbenzén vékonyrétegeket [44]. Hasonló kísérleti paraméterek mellett, de fűtött szubsztrátot és a céltárgy-szubsztrát között elektromos teret alkalmazva Ina és munkatársai

kristályos CuPc-t hoztak létre [45]. Szerves anyagok vékonyréteg tranzisztorként való alkalmazási lehetőségének szintén figyelmet szenteltek az utóbbi időben. Egy ilyen anyag a pentacén, amelyből a KrF lézer alkalmazásával készített vékonyrétegek tulajdonságai felülmúlták a hagyományos, párologtatásos módszerrel készített rétegeket [46]. Biológiai anyagok átmásolásának lehetőségét először 1990-ben Nelson mutatta ki vízbe fagyasztott DNS molekulák esetén [47]. Később Phadke and Agarwal demonstrálta, hogy nátrium-dodecil-szulfátban diszpergált glukóz-oxidáz enzimből KrF excimer lézer és Nd:YAG harmadik felharmonikusának (355 nm) alkalmazásával az enzimatikus képességét megőrző vékonyréteg készíthető [48]. Ugyanezen elrendezést alkalmazva riboflavin-foszfolipid keverék vékonyréteget állítottak elő, melyről kimutatták, hogy az alkotó molekulák megőrizték strukturális és funkcionális jellemzőiket [49].

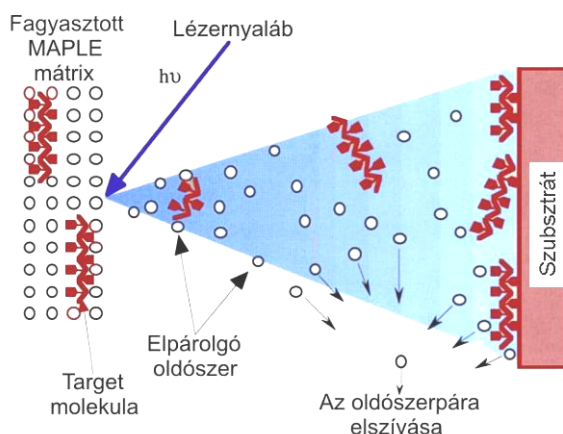
Tsuboi és munkatársai selyem fibroin vékonyréteget állítottak elő különböző hullámhosszú excimer lézereket (248 és 351 nm) alkalmazva [50]. Infravörös spektroszkópiai mérések szerint a 351 nm-es lézer alkalmazásával készített vékonyréteg kémiai összetétele megegyezett a kiinduló tömb anyagával. A vékonyréteg viszont amorf szerkezetű volt annak ellenére, hogy a céltárgy antiparallel β -szerkezetű volt. 0,1 % antracénnal adalékolt céltárgyat alkalmazva a vékonyréteget alkotó anyagnak nagy része már β -szerkezetű volt [51]. Az antracén szerepe a lézer sugárzás elnyelése és hővé alakítása volt, megvédve ezáltal a fibroin molekulákat a peptid láncok gerjesztődésétől mely a β -szerkezet roncsolásához vezet.

Bár megfelelő körülmények esetén általában a céltárgy sztöchiometriáját megtartva hozhatunk létre szerves vékonyrétegeket a tradicionális PLD-vel, hátrányait tekintve meg kell azonban még itt említeni, hogy bonyolultabb, érzékenyebb biológiai anyagok pl. fehérjék és egyéb nagy atomszámú, összetett molekulák egy az egyben történő átvitelére az alkalmazott nagy energiák miatt az irodalomban nem tartják alkalmasnak.

I.3. MAPLE

A PLD azon hátrányának kiküszöbölésére fejlesztették ki a MAPLE (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation) eljárást, miszerint az alkalmazott relatíve nagy teljesítménysűrűségek eredményeképpen bekövetkező roncsolódás miatt a módszer nem alkalmas összetett, sérülékeny biológiai anyagokból történő vékonyréteg leválasztásra. Alapját szintén az abláció képezi, melynek során elvileg nincsen direkt kölcsönhatás a lézer és az átvinni kívánt anyag között. Ez az eljárás úgy próbálja kiküszöbölni a PLD-nek a

célszóra vonatkozó esetleges káros hatásait, hogy a rétegbe építendő anyagot valamilyen illékony oldószerben feloldva, majd ezt az oldatot lefagyasztva, készítik el az ablálandó célanyagot. A lényeg a korábbi elméletek szerint az, hogy a lézer és a leválasztandó anyag között ne legyen közvetlen kölcsönhatás, hanem a fagyott, szilárd állapotban lévő oldószer nyelje el az energiát és a kilökődés során a mátrix anyaga legyen az, amely a benne oldott sűrűlékeny molekulákat magával sodorja. Az oldószer illékonyasága azért fontos, hogy a vákuumban a lézerrel felmelegített oldószer részecskék ne kötődjenek meg a készülő rétegben, ha érintkeznek vele, vagy ha lehetséges el se jussanak a szubsztátig (I.3. ábra) [52].



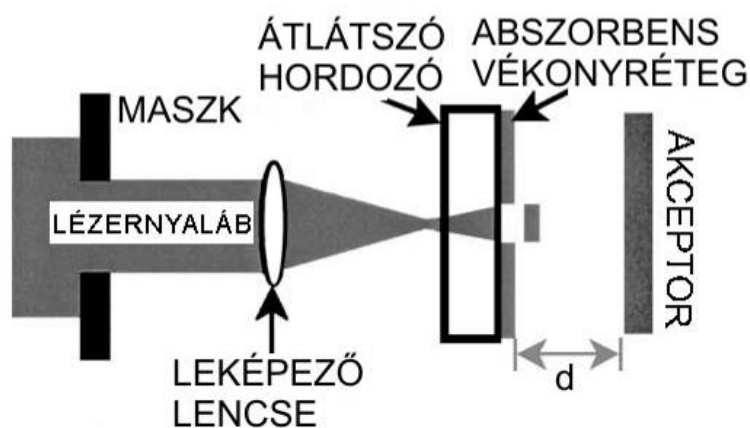
I.3. ábra Vékonyréteg építés MAPLE módszerrel

A MAPLE technológia tehát egy második anyagot és egy további berendezést igényel a hagyományos PLD-hez képest. Ez azt jelenti, hogy keresni kell valamilyen jó oldószert, ami alkalmas a kísérlet célszójának a feloldására, valamint egy hűtőrendszert is be kell építeni a vákuumkamrába. Az irodalomban fellelhető cikkek alapján az oldószer lehet pl. benzol, különféle alkoholok vagy akár víz is [53-56]. A hűtési megoldásokat pedig annak megfelelően kell kiválasztani, hogy milyen tulajdonságú oldószert kívánnak használni, hogyan lehetséges a laborban található berendezéseket bővíteni, mennyire kívánják lehűteni az oldatokat.

I.4. LIFT

Többek között a mikroelektronikai iparban alkalmazott optikai maszkok átlátszó hibáinak korrekciójára lett kifejlesztve a lézeres vékonyréteg-átmásolás, az angol Laser Induced Forward Transfer elnevezésből adódóan LIFT-nek nevezett eljárás. Ennél a nagy abszorpciójú átmásolandó anyagot egy, az alkalmazott lézer hullámhosszán átlátszó hordozóra viszik fel

vékonyréteg formájában (donor). A hordozó felől a vékonyrétegre irányított, megfelelő energiával rendelkező egyetlen lézer impulzus kivágja belőle a kívánt alakzatot, és egyben átrepíti arra a felületre, ahol a mintázatra szükség van (akceptor). Konkrét esetekben azonban a követelményeknek minden szempontból megfelelő másolat(ok) létrehozása komoly optimalizációt igénylő feladat. Bohandy és munkatársai 1986-ban jelentették meg cikküket, melyben rezet vittek át excimer lézeres besugárzás segítségével. Kimutatták, hogy kicsiny, $\sim 10\ \mu\text{m}$ donor-akceptor távolság esetén az elérhető legkisebb átmásolt felület megegyezett a lefókuszált lézernyaláb méretével [57]. A további kísérleti és elméleti vizsgálataik azt bizonyították, hogy a célanyag megolvad a besugárzás hatására, s a közte és a hordozó között kialakuló gőzréteg hirtelen tágulása röpíti le annak felületéről az akceptor felé [58] (I.4. ábra). Tóth Zsolt és munkatársai wolfram excimer lézeres másolását vizsgálták. Kimutatták, hogy az alkalmazott lézer energiasűrűségétől függően nemcsak olvadék állapotban következhet be másolás, hanem szilárd és gőz formában is [59].

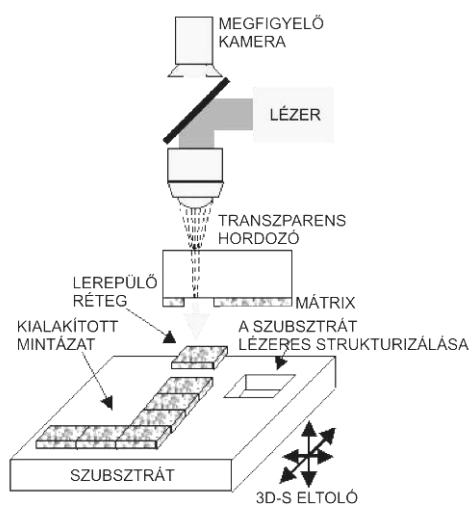


I.4. ábra A LIFT eljárás vázlatos rajza

Szegedi kutatók a módszer egyik legelső alkalmazásaként mikrométerű fémfoltok adott helyre másolását valósították meg a hordozó és a fémréteg páros megfelelő megválasztásával és a megmunkáló lézerimpulzus energiájának, hosszának és időbeli lefutásának optimalizálásával. Kimutatták, hogy néhány száz nm vastag wolfrám vékonyrétegeknek egy elektronikusan vezérelt, diódapumpált Nd:YAG lézer néhány száz mikroszekundum félértékszélességű háromszög-impulzusaival kiváltott átmásolásával az átlátszó hibák tökéletesen javíthatók [60]. Azóta számos tanulmány bizonyította, hogy LIFT módszerrel többféle anyagot, többféle lézer alkalmazásával át lehet másolni. Elsősorban fém filmeket (pl. alumíniumot [61], aranyat [62], rezet [57,62], krómot [62,63], ónt, vanádiumot, titánt [63,64], fémoxidot (In_2O_3 [62]), félvezetőt (Ge-ot [63]), szupravezetőt (YBaCuO, BiSrCaCuO [65])) vittek át, de hamar

kiderült, hogy a módszer alkalmas lehet érzékenyebb, pl. bioanyagok átmásolására is. DNS sikeres kontrollált lézeres átvitelét hajtották végre Colina és munkatársai Nd:YAG lézer 355 nm-es impulzus sorozatával [66] és Zergioti és munkatársai nanoszekundumos és femtoszekundumos KrF excimer lézerrel [67]. Tsuboi és munkatársai luciferáz enzimet vittek fel szintén 355 nm-es Nd:YAG lézerrel különböző hordozókra [68].

A MAPLE és a LIFT technikák feladatoptimalizált ötvözte a MAPLE direktírás (MAPLE-DW) módszere. Ennek során az átmásolandó sérülékeny biológiai mintát mátrixanyagba keverve vékonyréteggént felviszik az átlátszó hordozóra, majd a hagyományos LIFT elrendezésnek megfelelően sugározzák be lézerrel, s így juttatják el a vele szemben elhelyezett akceptorra (I.5. ábra).



I.5. ábra A MAPLE-DW elrendezés felépítése

Ezzel a módszerrel alakítottak ki Ringeisen és munkatársai mintázatot E-coli baktériumokból szilícium, üveg és táptalaj felületeken. Az átmásolt baktériumokat fluoreszcencia mikroszkópiával vizsgálták, s megállapították, hogy többségük megőrizte életképességét az eljárás során [69]. Wu és munkatársai kínai hörcsög petesejteket és torna-peroxidáz enzimet vittek át az akceptorra károsodás nélkül MAPLE_DW technikával [70], míg ugyancsak Ringeisenék embrionális rákos sejteket másoltak át ezzel a módszerrel 95 %-os túlélési aránnyal [71].

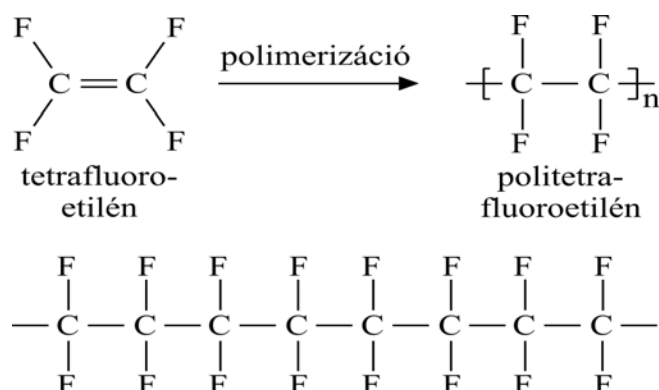
II. A VIZSGÁLT CÉLANYAGOK

Mint az Irodalmi áttekintés fejezetből kiderült, korábbiakban sikerrel alkalmazták az impulzus lézeres leválasztást szervesen vékonyrétegek készítésére. Az utóbbi évtizedekben kiderült azonban az is, hogy a módszer alkalmas lehet egyszerűbb, stabilabb, kevésbé sérülékeny bioanyag filmek előállítására is. Azonban összetettebb, érzékenyebb biológiai, biokompatibilis anyagokkal nem sokan próbálkoztak, mivel a módszer elmélete alapján igen kicsi volt annak a valószínűsége, hogy a lézeres abláció hatására kémiai vagy termálisan szétbontott óriásmolekulák újra összeállnak a hordozóra való becsapódás után. A MAPLE technika bevezetése némileg segített ezen a problémán, azonban sok célanyaghoz nem sikerült megfelelő mátrix anyagot találni. A kísérleti tapasztalatok alapján azonban nyilvánvaló volt, hogy egyes speciális esetekben a vékonyréteg leválasztás nem a hagyományos elméletnek megfelelően történik. Véleményem szerint szükségessé vált tehát a vizsgálandó anyagok körének jelentős kiszélesítése, bonyolultabb szerves anyagok leválasztási kísérletekbe való bevonása. A célanyagok kiválasztásánál ezen felül az is motivált, hogy az előállított biológiai, biokompatibilis vékonyrétegek milyen gyakorlati alkalmazási lehetőséggel rendelkezhetnek, mire lehet őket használni. Ennek megfelelően ebben a fejezetben röviden ismertetem az általam alkalmazott céltárgy anyagokat, s azok főbb jellemzőit. Vizsgáltam biokompatibilis polimert (Teflon), biológiailag lebomló polimereket (polihidroxibutirát, poliglikolsav), enzimeket (pepszin, ureáz), humán anyagot (fogpor) és proteineket.

II.1. Teflon

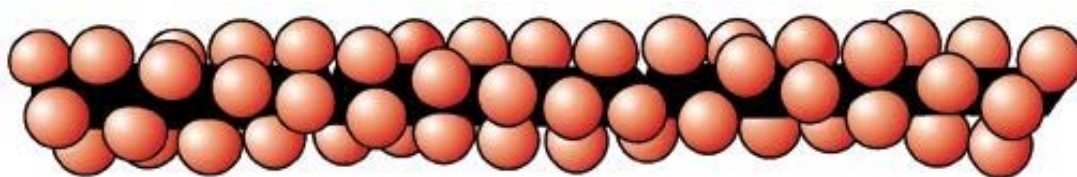
A politetrafluoroetilén (Teflon, PTFE) egy sor olyan fizikai és kémiai tulajdonsággal rendelkezik – mint alacsony sűrűlési együttható, kis dielektromos állandó, alacsony adhézió, kémiai és termális stabilitás – melyek nélkülözhetetlenné teszik sok, már jelenleg is elterjedt eljárás kivitelezésében, illetve lehetővé teszik az alkalmazási lehetőségeinek jövőbeli kibővítését [72,73]. Sokféle kémiai alkalmazását nagyfokú vegyszerállósága teszi lehetővé. A Teflon, mint köztudomású, érzéketlen az agresszív anyagok, mint például a sósav, folyosav, füstölő kénsav és salétromsav, forró nátriumhidroxid oldatok, klórgáz, hidrazin vagy nátriumoxid támadására, mint ahogy nem reagál az alkoholok, észterek, ketonok vagy sav-

kloridok hatásaira sem [74]. Ezen tulajdonságokért a szén-fluor kötés erőssége és a szénláncnak a fluor atomok által történő fedése a felelős. A polimer lánc relatíve hosszú és lineáris (II.1. ábra) [75].



II.1. ábra A Teflon molekula felépítése.

Ellentétben a lineáris hidrokarbonok síkbeli „zigzag” szerkezetével, ebben az esetben a relatíve nagy fluor atomok spirálisan helyezkednek el, ezzel téve a makromolekulát tömörré és merevvé (II.2. ábra).



II.2. ábra A politetrafluoroetilén spirális molekulája.

Ennek következtében ezek a molekulák könnyen képesek kristályosodni. A gyenge molekulák közötti erők meghatározzák a PTFE mechanikai tulajdonságait. Viszonylag erős anyag, nyúlási erőssége a 7-28 MPa tartományba esik, a gyártási módszertől függően.

Az orvostudományban is számos területen alkalmaznak politetrafluoroetilént, főként implantátumok készítésére, mivel egészségügyileg teljesen veszélytelen. Nem okoz bőrgyulladást, az állatokkal végzett etetési kísérletek során hónapokon keresztül sem mutatott semmiféle káros hatást. Teflon protézisek az élő szervezetbe beültetve (ez már a sebészetben rutin feladat) nem okoztak panaszt. Néhány technikai alkalmazás a Teflon igen alacsony súrlódási tényezőjét (0,04 acélon) használja ki. A napelem technológiában magas termális stabilitása és nagyfokú időjárás-állósága miatt kedvelt anyag [76].

A legközismertebb tulajdonsága a Teflonnak az adhézios viselkedése. Mivel igen alacsony felületi energiával rendelkezik, ezért nem nedvesíthető szinte semmilyen folyadékkal (kivéve néhány perfluorozott hidrokarbont) és nem is ragasztható hatékonyan.

Mindez azt jelenti, hogy a PTFE hidrofób és oleofób egyszerre. A széleskörű alkalmazás ellenére ezek a tulajdonságok komoly problémát jelentenek a felületkezelés és rögzítés során. Az adhézió megnövelhető egy reakcióközegben lejátszódó lézerindukált fotokémiai módosítással [77-82]. A felület morfológiája és ennek következtében tapadása megváltoztatható nagyobb energiasűrűségű (ablációs küszöb feletti) excimer lézeres besugárzással, ablációval [83-88].

A hagyományos módon előállított Teflon alkalmazása az elektronikai iparban korlátozott nagy kristályossági foka és alacsony adhéziója miatt. Amorf szerkezetű PTFE vékonyréteg előállítására több módszer is ismeretes, mint például a vákuum-párolgatás, nagyfrekvenciás porlasztás, vagy fluorokarbon monomer gázok plazma-polimerizációja, azonban kimutatták, hogy ezen módszerekkel készült PTFE filmek fluor-hiányosak, könnyebben oxidálódnak, kémiaiilag nem tökéletesek [89]. Az utóbbi évek folyamán számos kísérlet irányult Teflon vékonyrétegek impulzuslézeres vékonyréteg építéssel történő előállítására ultraibolya lézerek alkalmazásával [90-92]. Az elmélet szerint az UV abszorpció hatására a szerves molekulák magasabb elektrongerjesztési állapotba kerülnek, ami vagy közvetlen kötésfelszakadást okoz, vagy az elektronok gerjesztési energiája rövid idő alatt átalakul vibrációs energiává, ami együtt jár a céltárgy nagymértékű felmelegedésével, és kellő intenzitás esetén az abszorbeáló molekulák termális disszociációjával. A depolimerizáció során monomerek keletkeznek, melyek robbanásszerűen kilökődnek a céltárgy felszínéről, és a szubsztrátra lerakódva újrapolimerizálódnak. Mivel a nagy energiájú lézernyaláb hatására a molekulaszervezet meglehetősen ellenőrizhetetlen módon bomlik fel, a szerves anyagok UV fotoablációja általában alkalmasabb anyageltávolításra, mint vékonyréteg építésre. Mindazonáltal spektroszkópiai vizsgálatok bebizonyították, hogy megfelelő kísérleti körülmények mellett a PLD technológia is alkalmas eszköz lehet a kívánalmaknak megfelelő minőségű, sztöchiometrikus Teflon vékonyréteg leválasztására. Kimutatták, hogy a leválasztott PTFE film szerkezete a PLD eljárás közbeni szubsztrát-hőmérséklettől is függ [92-95]. 200 °C alatt a leválasztott film amorf, magasabb szubsztrát-hőmérsékletek esetén mind amorf, mind kristályos összetevőket tartalmaz. A transzmissziós IR spektrum vizsgálata alapján az amorf és a fél-kristályos változatok kémiaiilag azonosnak bizonyultak.

Mindezekből kitűnik, hogy Teflon vékonyréteg leválasztása PLD-vel már kutatott terület néhány éve. Azonban a réteg fontos tulajdonságait, mint pl. struktúráját, keménységét, hordozóhoz való tapadását, átersztőkéességét, stb. és gyakorlati alkalmazási lehetőségeit nem vizsgálták részletesen. Az irodalomban fellelt eredmények alapján reálisnak tűnt számomra célul kitűzni olyan tömör, a szubsztráthoz jól tapadó Teflon vékonyrétegek PLD-

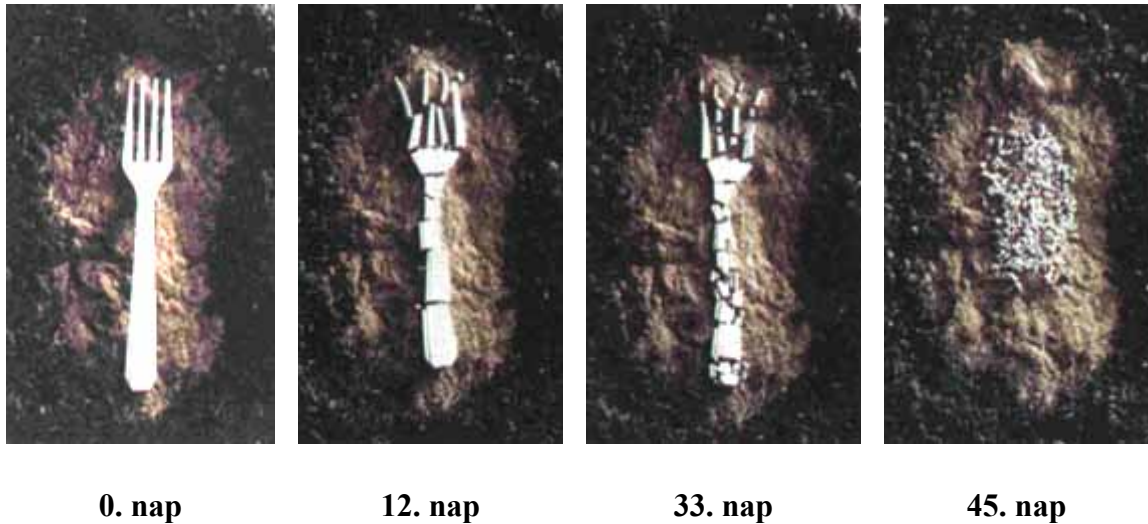
vel történő előállítását, melyek alkalmasak lehetnek egy fontos gyakorlati feladat ellátására, allergén tárgyak emberi szövetből való elszigetelésére az allergiás reakciók elkerülése érdekében. Ezen célkitűzés azonban igényli a fentebb emlegetett tulajdonságok pontos ismeretét, ezért kutatómunkám első részében ezekre koncentráltam.

II.2. Biopolimerek

A folyamatosan növekvő műanyag-felhasználással együttjáró hulladéktömeg növekedés megakadályozásának egyik útja lehet a lebomló műanyagok bevezetése és használata. Alapvetően két csoportjukat különböztethetjük meg: 1. fény hatására bomló és 2. biológiailag bontható műanyagok.

1. A napfény 200-600 nm hullámhosszúságú sugarainak abszorpciója 586-200 kJ/mol gerjesztési energiának felel meg, amely elég a kémiai kötések zömének megbontásához, fotolízises disszociálódásához. Tekintettel arra, hogy az ózon szűrő hatása miatt a 290 nm-nél rövidebb hullámhosszúságú (>400 kJ) sugárzás nem jut el a földfelszínre, így olyan csoportok műanyagokba való beépítésével lehet a kívánt eredményt elérni, amelyeknek az abszorpciós maximuma 290 nm felett található. Ilyen csoport például a karbonil-csoport, mely 300-325 nm tartományban abszorbeál. Már 1 %-nyi karbonil-csoport sztirolba való beépítésével olyan polisztirolt tudnak előállítani, amelyből készült poharak a lakásban stabilak, a szabadban azonban 2-3 hét alatt kis molekulatömegű porrá esnek szét, és ezeket a természetben megtalálható mikroorganizmusok már hasznosítani tudják. A talajlakó mikroorganizmusok sejtjei a kb. 30 szénatomnál kisebb fragmentumokat már képesek lebontani [96].

2. Biodegradáció alatt azt a folyamatot értjük, amikor mikroorganizmusok (gombák, baktériumok), elsősorban specifikus enzimreakcióik segítségével lebontják, és végeredményben tápanyagként használják fel a polimereket vagy összetevőiket. Ennek a folyamatnak eredményeként a műanyag visszatér a természetes körfolyamatokba. A II.3. ábrán egy politejsavból készült villa biodegradációjának folyamatát láthatjuk [97].



II.3. ábra Politejsavból készült termék biológiai degradációja

Az olyan polimereket, amelyek természetes vagy mesterséges körülmények között biológiailag lebonthatók, biodegradálható polimereknek, röviden biopolimereknek nevezzük. Biológiai lebomlás alatt a mikroorganizmusok (gombák, baktériumok) hatására végbemenő lebomlást értjük, amelynek során a mikroszervezetek feltárják és a növények számára ismét felvehető formájúvá alakítják a szerves anyagok felépítésében, az energia raktározásában és transzportjában résztvevő biogén elemeket. A természetben a mikrobák mellett kémiai (hidrolízis, oxidáció) és fizikai, illetve mechanikai (napfény, időjárás, kimosódás, mechanikai igénybevétel) hatások is szerepet játszanak a folyamatban. Ennek a folyamatnak az eredményeképpen a műanyag visszatér a természetes körfolyamatba. A lebomlás során mérgező anyagok nem keletkeznek. A biodegradáció során oxigén jelenlétében a csak szén-, hidrogént és oxigént tartalmazó anyagok végül szén-dioxidra és vízre bomlanak, míg oxigén mentes közegben metán is képződik.

Biológiailag lebomló műanyagokra elsősorban a csomagolóiparban, a mezőgazdaságban, valamint a gyógyászatban van nagy igény. A gyógyászatban ezeket az anyagokat felszívódó anyagoknak nevezik, ugyanis az emberi szervezetben lebomlanak, elhidrolizálnak. Főbb csoportjaik: 1) Természetes ill. bioszintetikus polimerek: A számos bioszintetikus polimer közül műanyagipari jelentősége egyelőre még csak a poliszacharidoknak; ezen belül is a keményítőnek és a cellulóznak van. 2) Mesterségesen előállított biopolimerek: Hagyományos polimer-kémiai, illetve enzimes úton szintetizált, nem kőolaj alapú, általában természetes nyersanyagforrásokra támaszkodó polimerek (pl. politejsav, polikaprolakton). 3) Mesterségesen előállított, társított biodegradálható anyagok: Kőolaj alapú, nagy

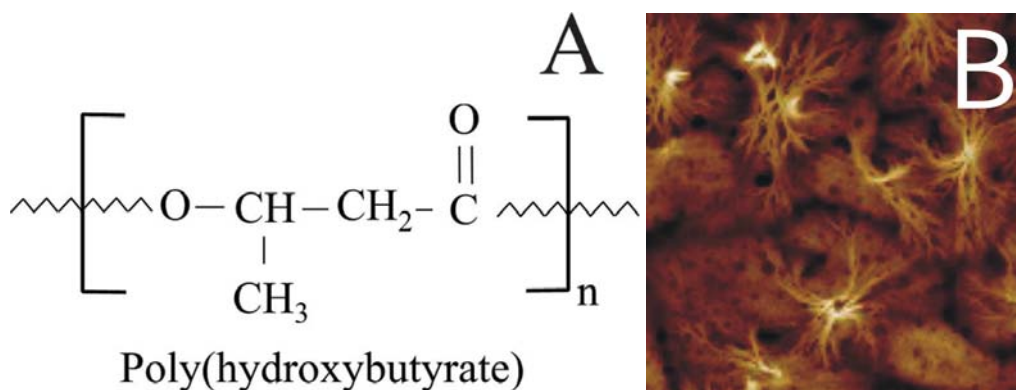
menyiségben gyártott polimerekből biológiailag lebomló polimerekkel való társítással, kopolimerizációval előállított, (esetleg csak részben) biodegradálódó anyagok.

A biopolimer műanyagok főbb felhasználási területei táblázatban összefoglalva:

Csomagolás	hordtáskák; tasakok; szemetes zsákok; raklapok; fóliák; palackok; téglék; térkitöltő csomagolás;
Gyógyászat	gyógyszerhordozó kapszulák (szabályozott hatóanyag kibocsátás); mesterséges bőr és egyéb szövetek, szervek; felszívódó protézisek, implantátumok; sebkötöző anyagok; biodegradálódó varratok, kapszok és egyéb rögzítők, sebészeti kellékek;
Fogyasztási cikkek	egészségügyi törülköző; pelenka; intim higiéniai termékek; takarító cikkek; eldobható evőeszközök;
Mezőgazdaság	műtrágyaszákok; fóliák; palántatartók; kötözőszinórok; peszticid és herbicid szalagok, illetve adagolók;
Egyéb	vegyszerhordozók; bevonatok; vizek denitrifikációja;

1. táblázat

A **polihidroxibutirátot** (PHB), mint igen érdekes jellemzőkkel rendelkező anyagot, még a század elején fedezték fel bizonyos növényekben és baktériumokban a Pasteur Intézet munkatársai. Az 1950-es évek elejére sikerült az anyag szerkezetét is azonosítani. A fizikai jellemzőket meghatározva kiderült, hogy a PHB kristályos, hidrofí, de nem vízzoldékony anyag (olvadáspont 180 °C). A magas olvadáspont széleskörű felhasználást tesz lehetővé. Biokompatibilitásának köszönhetően alkalmazható az orvostudomány területén. Hőre lágyuló, porózus anyag, jó a vízgőzáteresztő képessége, oxigén áteresztő képessége viszont csökken a réteg vastagságával [98]. Orvosi alkalmazásai szerteágazóak, így pl. szív-műtétknél a szívburkok „foltozására”, koszorúér és szívbillentyű műtétknél, valamint egyéb műtéti eszközökként, pl. tamponok, sebfonalak formájában használják.



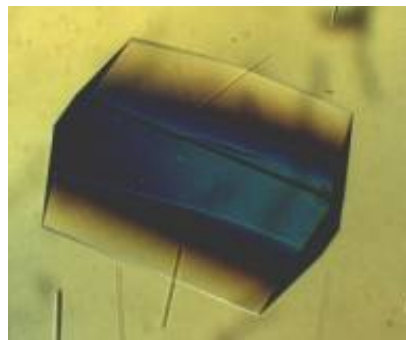
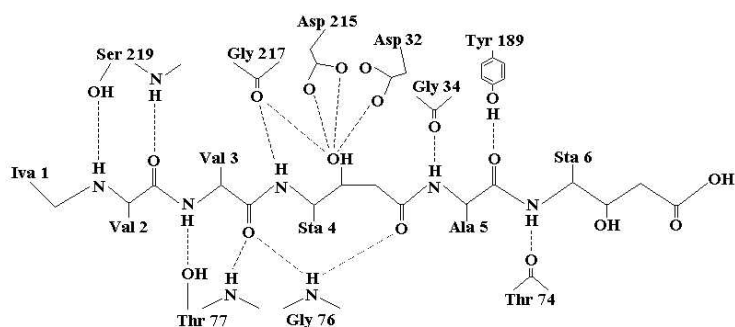
II.4. ábra A polihidroxibutirát molekulaszervezete (a) és mikroszkópos képe (b)

Egyik legrégebben bemutatott, és egyik legtöbbet vizsgált, teljesen szintetikus, felszívódó polimer a **poliglikolsav (PGA)**, a legegyszerűbb lineáris alifás poliészter. Ez volt az első teljesen felszívódó szintetikus polimer, amelyet Dexon márkanéven már a 60-as években forgalmaztak. Kristályossága viszonylag nagy (45–55%) és magas az olvadáspontja (220–225°C). A poliglikolsavból készített szálaknak nagy a szilárdsága és a modulusa, azonban túl merevek ahhoz, hogy varratanyagként alkalmazhassák, kivéve a fonatolt formációit. PGA varrat már 2 hét után elveszíti a szilárdsága 50 százalékát, 4 hét után már közel 100 százalékát, majd 4-6 hónap alatt teljesen felszívódik [99].

Habár a biopolimerek számos tulajdonságát már részletesen vizsgálták, belőlük még vékonyrétegeket nem választottak le PLD-vel, pedig természetes lebomlókéességük révén alkalmasak lehetnének időleges bevonat, védő-, szigetelőréteg feladatok ellátására.

II.3. Pepszin

A pepszin egy 1836-ban Schwann által felfedezett emésztőenzim a gerincesek gyomornedvében. Igen összetett anyag, egy 34500 móltömegű protein, amely 19 különböző aminosavból áll. Autokatalikus lebontással inaktív előanyagából, a pepszinogénből képződik [100]. Molekulastruktúrája és egy pepszin kristályról készült kép látható a II.5. ábrán.



II.5. ábra A pepszin szerkezete [101] és egy pepszin kristály fényképe [102].

Az emlősök táplálékuk fehérjetartalmának emésztését a gyomorban kezdik meg. A gyomor falában lévő sejtek pepszinogént termelnek, amelynek önmagában még nincs fehérjebontó hatása. A gyomorba jutva azonban érintkezik a gyomor savtartalmával (sósav) és az erősen savanyú közeg (pH=2) hatására aktív pepszinné alakul át. A pepszinogén tehát a pepszin prekursora, proenzimje [103]. A pepszinogén aktiválódása során a nagy hidrogénion-koncentráció és a már jelenlévő aktív pepszin hatására a prekuzormolekuláról hat, összesen 7500 molekulatömegű peptid hasad le, amelyek nyilvánvalóan ez ideig a pepszin aktív csoportjaihoz kötődtek és ezzel megakadályozták katalizáló hatásának kibontakozását. A pepszin a természetben előforduló csaknem minden fehérjét képes bontani. Kivételt az állati szervezetekben vázanyag szerepet betöltő, hálózatos szerkezetű szkleroproteinek (pl. hajkeratin), továbbá az elasztin és a nyers kollagén képez. A pepszin rendkívül erélyes és gyors lebontást végez.

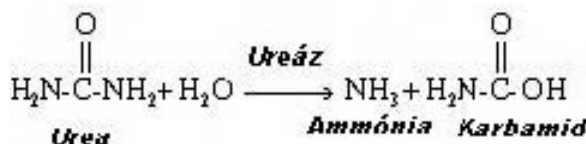
Hatása szempontjából a pepszin a peptidilpeptid-hidrolázokhoz (endopeptidázok) tartozik, és a proteinek, valamint szintetikus peptidek központi peptidkötéseit hasítja. A pepszines fehérjebontás eredményeként először a nagy és közepes molekulájú polipeptidek (proteózok, peptonok), majd néhány aminosavból álló peptidek és végül aminosavak keletkeznek. Az aminosavak szempontjából úgy tűnik, nincs nagy specifitása, de előnyben vannak az aromás csoportok. Katalizálóképessége az olyan peptidkötések bontásában a legnagyobb, amelyek szabad karboxilcsoportot és aromás oldalláncot tartalmazó aminosavakkal szomszédosak. A hőmérsékleti optimum 37 °C (testhőmérséklet), pH-optimuma 1,5...2,0 (a gyomor sósava biztosítja). Csak kevés protein rezisztens a pepszinnel szemben, így pl. a fibroin és a mucin a gyomornyálkahártyában, amelyek a gyomor peptolitikus „önemésztését” gátolják meg. A pepszin lebontási terméke egy peptidkeverék, 600 és 3000 közötti móltömeggel. Régebben az ilyen bomlástermékeket peptonoknak nevezték. A pepszin aktivitása igen nagy. Kedvező feltételek között egy pepszin-készítmény

saját súlyának több ezerszeresét képes megemészteni. Ezt szemlélteti, hogy 500 g pepszin néhány óra alatt kb. 20 t húst tud megemészteni, és pár perc alatt 4 millió liter tejet olvaszt meg. A pepszin aktivitását megfelelő fehérjestandardok lebontásán mérik, ilyen pl. a denaturált hemoglobin, ma szubsztrátként elsősorban a fenil-szulfítot ajánlják. A pepszin aktivitását gátolják az epesavak, a semleges sók, OH-ionok és egy, a pepszinogénben lévő természetes inhibitor. 70 °C fölé hevítve denaturálódik. A pepszin ipari előállítása vágóhídi állatok gyomornyálkahártyájából történik, vizes alkoholos vagy glicerines (5%-os) kivonással.

Kísérleteim célja ebben az esetben az volt, hogy bebizonyítsam, meg lehet találni azt a paraméterrendszert, amelynél impulzuslézeres leválasztási eljárással ebből a bonyolult enzimből, a pepszinből olyan vékonyrétegeket lehet készíteni, melyek megőrzik a kiindulási molekulaszervezet mellett a katalizáló képességüket is. Ez egyúttal azt is jelentené, hogy ez az eljárás alkalmas lehet egyéb, hasonlóan bonyolult, összetett biológiai molekulák direkt átvitelére, belőlük funkcionális vékonyrétegek leválasztására.

II.4. Ureáz

Az ureáz egy olyan enzim, mely számos baktériumban és növényben megtalálható, s az urea hidrolízisét katalizálja, ahol az ureából karbamid és ammónia lesz (II.6. ábra) [104].



II.7. ábra Urea hidrolízise

Ezt a reakciót használják fel például *Helikobakter pilori* gyomorbaktérium kimutatására is a következőképpen: a gyomorból endoszkópos vizsgálat során szövettani mintát vesznek, melyet urea tartalmú folyadékba helyeznek. A baktérium ureázt termel, mely bontani kezdi az ureát, és ilyenkor megfelelő színreakciót észlelünk, ebből következtethünk a kórokozó jelenlétére [105].

Érdekesség, hogy mind az urea, mind az ureáz korszakalkotó molekulák a korai tudományos vizsgálatokban. Az urea volt az első szerves molekula, amit szintetizáltak, és az ureáz (jack babból) volt az első kristályosított enzim, ráadásul ez volt az első enzim, amiről kimutatták, hogy nikkelt tartalmaz. A röntgendiffrakciós, EXAFS, ESR és mágneses

cirkuláris mérésekből megállapították, hogy minden ureáz enzim aktív centrumában két Ni(II)-ion található, amelyek egy karboxilátcsoporton keresztül kapcsolódnak egymáshoz.

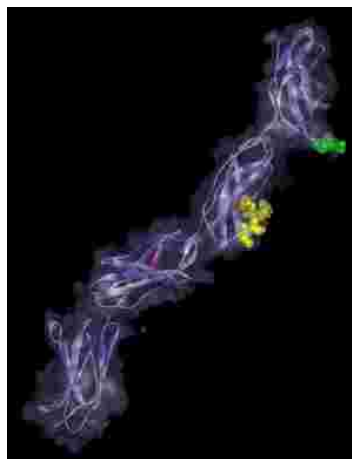
Az ureáz előfordul a kereskedelemben por alakban, vízben jól oldódik, biológiai aktivitása viszonylag egyszerűen tesztelhető, ezért többek között kiváló modellanyag az impulzus lézeres vékonyréteg készítési módszerek összehasonlításához, részletes leírásához, modellezéséhez.

II.5. Sejtmegtapadást elősegítő anyagok

Az alábbi anyagokat sejtenyésztési eljárások során szokták alkalmazni arra a célra, hogy elősegítsék az adott sejttípus jobb megtapadását a szükséges felületen.

a) Fibronectin

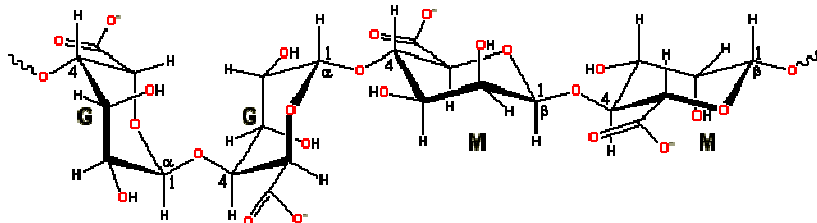
A fibronectin egy fehérje, ami a sejtközöti térhez (extracelluláris mátrix) kapcsolja a sejteket, és segít a szöveti struktúra kialakulásában és fenntartásában (II.8. ábra). Egyszerre több kötőhellyel is rendelkezik; a mátrix makromolekuláira és sejtfelszíni receptorokra specifikusakkal. A fibronectin egy valamennyi gerincesben megtalálható nagy glikoprotein, ami két, végükön diszulfid-hidakkal kapcsolódó alegységből áll. Egy fibronektinen lehet kollagént, heparint, sejtfelszíni receptort stb. kötő domain is. A fő rész egy tripeptid szakasz (RGD), ami közvetlenül felelős a sejthez kötődésért. A fibronektineknek fontos szerep jut a sejtváándorlási útvonalak meghatározásában is [106].



II.8. ábra Egy fibronectin molekula szerkezete

b) Nátrium-alginát

Az alginsav nátriumsója, egy természetes poliszacharidé, melyet különböző tengeri algák termelnek (II.9. ábra). Ételadalék, sűrítőanyag, szilárdítószer, gélképzőszer, emulgeálószer. Sárgás-fehér szálás, darabos vagy porformájú, gyakorlatilag íztelen és szagtalan anyag [107].



II.9. ábra A nátrium-alginát kémiai szerkezete

c) Kollagén

A kollagén egy szerkezeti protein, a bőr kötőszövetének hetven százalékát alkotja. A bőr, csont, porc vázfehérjéje, a kötő- és tartószövet legfontosabb alkotórésze, valamint hozzájárul a kapillárisok és fogak megfelelő felépítéséhez is. Erőt és rugalmasságot biztosít a test különböző szöveteinek és sejtjeinek. Fiatalkorban még oldott állapotban található meg a szervezetben. Molekulái egymás irányába eltolhatók, vízvisszatartó képességük kiváló, ennek köszönhető a bőrünk rugalmassága. A kor előrehaladtával azonban a kollagén egyre merevebb, oldhatatlanabb lesz, vízmegkötő képessége csökken, ezáltal a bőr rugalmatlanná, ráncossá válik. A kollagént tartalmazó készítmények javítják a bőr vízmegkötő képességét. A gyors sejt-kitapadást és monolayer képződést fibrilláris kollagén és fibronectin kombinálásával előállított extracelluláris mátrix bevonat alkalmazásával segítik elő mesterséges sejtenyészetekben. Marha bőrből, vagy tengeri állatokból vonják ki [108].

III. CÉLKITŰZÉS

Az utóbbi évtizedekben a lézerek bioszenzor-technikai, biológiai és orvosi célú alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata vált az egyik legdinamikusabban fejlődő kutatási területté, melyre fokozottan igaz az interdiszciplináris jelző. Itt a jelenségek értelmezéséhez, megértéséhez, az elért eredmények felhasználásához elengedhetetlenül szükséges a megfelelő fizikai, kémiai, biológiai, orvosi szakterület minél részletesebb, szélesebb körű ismerete. Fizikusként természetesen az általam tanulmányozott részterület fizikai aspektusait, lehetőségeit, jellemzőit kívántam vizsgálni kutatómunkám során.

Ennek megfelelően az alábbi feladatokat tűztem ki célul:

Bebizonyítani, hogy mind a nanoszekundumos, mind pedig a szubpikoszekundumos impulzus lézeres leválasztás módszere alkalmas sérülékeny, összetett biológiai, biokompatibilis vékonyrétegek készítésére is, melyek potenciálisan alkalmazhatók lehetnek az orvostudományban, szenzortechnikában.

- Ezen belül konkrétan meghatározni azokat az optimális leválasztási paramétereket, melyek alkalmazása esetén sztöchiometrikus Teflon, polihidroxibutirát, poliglikolsav, pepszin, fog, ureáz vékonyrétegek állíthatók elő.
- Bebizonyítani, hogy a megfelelő kísérleti feltételek esetén lehet PLD-vel készíteni olyan Teflon rétegeket, melyek alkalmasak lehetnek védőbevonat feladat ellátására, azaz allergén fémtestek szervezettől való elszigetelésére.
- Meghatározni azon paramétereket, melyek esetén az átvitt pepszin a kémiai azonosság mellett megtartja biológiai aktivitását is.
- Annak demonstrálása, hogy egyáltalában lehetséges vékonyréteg leválasztása egy abszolút szövetbarát anyagból, az ember saját fogának anyagából, mely elősegítheti fogászati implantátumok szövetbe való beépülését.
- Ureáz vékonyréteg készítése MAPLE és PLD technikákkal, a két módszer összehasonlítása. Az eredmények ismeretében kidolgozni egy modellt mindkét eljárásra, melyekkel azok az általam alkalmazott speciális esetekben is leírhatók.
- PLD-vel olyan struktúrált vékonyrétegek leválasztása, melyek segítségével irányított sejtmegtapadás, növekedés valósítható meg.

Kifejleszteni egy olyan eljárást, mely alkalmas lehet érzékeny biológiai objektumok, spórák, sejtek kontrollált átvitelére.

- Ezen belül konkrétan meghatározni azokat az optimális átviteli paramétereket, melyek alkalmazása esetén a biológiai minták túlélési aránya megfelelően magas, bebizonyítani a módszer hatékonyságát spórák és különböző élő sejtek esetére is.
- Időfelbontásos vizsgálatokkal meghatározni a minták átmásolás során elért gyorsulását, sebességét, kidolgozni egy modellt a jelenségek leírására.

Az AFA-LIFT-es kísérletek során felfedezett, átlátszó anyagok lézeres indirekt finom-megmunkálására szolgáló új módszer vizsgálata.

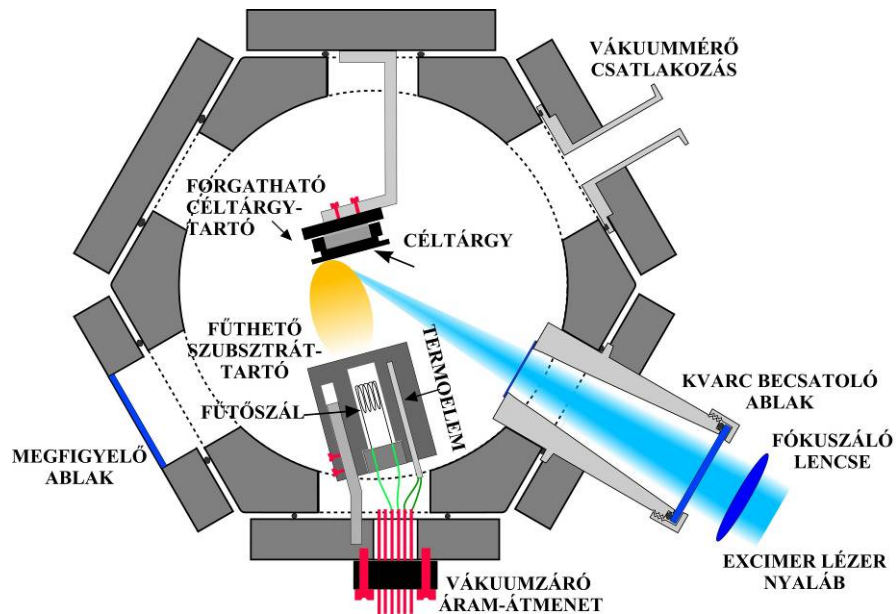
- Bebizonyítani, hogy a módszer hatékonyabb, környezetkímélőbb, gazdaságosabb a pillanatnyilag alkalmazott egyéb lézeres eljárásoknál.
- Demonstrálni, hogy ezzel a technikával nanostruktúrák marhatók bele lézerrel átlátszó anyagokba.
- Kimutatni, hogy a módszer alkalmazható látható fényű megmunkáló lézerforrás esetén is.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Biokompatibilis és biológiai vékonyrétegek előállítása impulzuslézeres vékonyréteg leválasztással

IV.1.1. Az alkalmazott kísérleti elrendezés (PLD-kamra)

A vékonyréteg leválasztási kísérleteim megkezdése előtt munkatársaimmal megterveztük és megépítettük a vékonyrétegek előállításához szükséges speciális vákuumkamrát, azaz a PLD-kamrát (IV.1. ábra).



IV.1. ábra Az impulzuslézeres vékonyréteg építési eljárashoz elkészített vákuumkamra vázlata.

A kamrát rozsdamentes acél munkadarabból készítettük el. Alakját úgy választottuk meg, hogy multifunkcionális legyen, azaz többféle elrendezést is ki lehessen benne alakítani. Erre a célra egy hatszög alapú hasábot tartottunk a legmegfelelőbbnek. Mind a hat oldallapra nyílásokat vágattunk, melyekhez ún. alaplapok segítségével többféle PLD modult is csatlakoztathatunk. Maga a PLD-kamra ezen belül több fontos elemből áll: forgatható céltárgytartó, fűthető szubsztáttartó, kvarc belépő és megfigyelő ablakok. A szubsztátt fűtését egy 100 W teljesítményű, 24 V-os halogén izzó biztosította. A hőmérséklet egy K típusú termoelemmel volt mérhető, mely a szubsztátttartóban volt elhelyezve néhány milliméterrel a szubsztátt alatt. A hőmérsékletet egy digitális On-Off kontrollerral szabályoztam. Az elérhető maximális hőmérséklet körülbelül 400 °C volt. A szubsztátttartót olyan mozgatható állványra helyeztem, amely lehetővé tette a céltárgy-szubsztátt távolság 2,5-5 cm tartományon való

változtatását. Az excimer lézer nyalábját egy 5 cm átmérőjű, 3 mm vastag kvarc ablakon keresztül vezettem be a vákuumkamrába. A felsoroltakon kívül a vákuumkamra tartalmaz még egy darab megfigyelő ablakot (üvegből) is, mely lehetővé teszi a minta in-situ megfigyelését.

IV.1.2. Szervezetbarát Teflon védőrétegek leválasztása allergén tárgyak felületére

a) Az allergia

Habár ez a rész nem az én eredményeimet tartalmazza, de mivel a Teflon vékonyréteg építési kísérleteimet a kontaktallergia elleni védekezés motiválta, ezért ebben a fejezetben először az allergiával kapcsolatos legfontosabb ismereteket foglalom össze röviden.

Az allergia a test abnormális válaszreakciója egy vagy több olyan anyagra, amely ártalmatlan a legtöbb ember számára. Az ergia görög szó, jelentése: valamire reagálni, választ adni. A belőle képzett allergia szó eltérő válaszáradást, másképpen reagálást jelent. A szervezet hibás védekezése ez, védekezünk valami ellen, ami ellen nem is kellene. Beszélhetünk perenniális, azaz egész évben tartó (pl. házipor) és szezonális allergiáról (pl. pollen). Mindazt, ami allergiás reakciót vált ki, allergénnek nevezzük. A testbe különféle módon jutnak be az allergének: némelyik egyszerűen inhalálás útján, mint pl. a pollenszemek, a lakáspor, az ételekben és gyógyszerekben található allergének pedig az emésztőcsatornán keresztül. Bejuthatnak még érintés útján, mint pl. az ékszerek vagy a nikkelezett pénzürmék esetén, illetve bizonyos gyógyszerek allergénjei és a fullánkrovarok mérgei bőrön keresztül (beinjektálva) hatolnak a testbe. Az antigén (antitest) egy olyan anyag, amelyet a szervezet normális körülmények között termel. Az antigén termelés a szervezet természetes védekezése különböző fertőzések és más megbetegedések ellen. Az ember valamilyen külső hatásra többféle reakciót mutathat, ami tulajdonképpen a gyulladás mértékétől függ. Normergiáról beszélünk akkor, ha egy külső hatás teljesen normális reakciót vált ki az emberből. Ilyen, amikor az egészséges ember szervezetébe kórokozó kerül, ami miatt ellenanyagot termel. Ezt használják ki az oltásoknál is, hiszen régebben a legyengített kórokozót adták be, amely ellen az egészséges szervezet ellenanyagot termel, és ily módon védetté válik a kórral szemben anélkül, hogy bármilyen nagyobb betegségen esett volna át. Anergia esetén a szervezet nem reagál a külső hatásra, vagyis nem termel ellenanyagot a bejutott kórokozó ellen. Hiperergia, amikor a beteg túlzott ellenhatást mutat a külső hatásra, és már nem a kórokozó, hanem maga

ez az erős ellenhatás lesz a betegség okozója. Bár a köznyelvben ezt a hiperergias állapotot nevezzük allergiának, tudnunk kell, hogy az allergia tulajdonképpen a normális reakciótól való eltérés, vagyis a nem, illetve a túlzott reagálás is az allergia fogalmába tartozik [109-111].

Mai ismereteink szerint az allergia nem vagy csak nagyon nehezen gyógyítható. Ezért az allergiás beteg legfontosabb feladata az allergénnel való találkozás kerülése, azaz a megelőzés. Por- és pollenallergia esetén ez megoldható légszűrő beépítésével, gyakori takarítással, szélsőséges esetben más vidékre költözés segíthet. Az érintés útján, bőrön át felszívódó allergénnel azonban nem ilyen egyszerű a helyzet. Nagyon gyakori például az egyes fémekkel (nikkel, higany, arany, ólom, titán, ezüst, króm, stb.) szembeni allergia [112-114]. Ennek legfőbb okozói a bőrrel gyakran érintkező fémtárgyak, mint például az ékszerek, karórák hátlapja, szemüvegkeret szára, cipzár, evőeszközök, stb., illetve a szervezetbe beépített fém gyógyászati segédeszközök, fogtömések, implantátumok. Azonban ha pontosan akarunk fogalmazni, akkor azt kell mondanunk, hogy fémallergia tulajdonképpen nem létezik: a szervezet immunrendszere a fématomokat önmagukban nem is veszi észre. A fématomok azonban kapcsolatba kerülnek a szervezet saját fehérjéivel, és azokat módosítva új, a szervezet számára idegennek tűnő anyagot állítanak elő. A szervezet ezen „idegen anyag” ellen védekezik, aminek látható jele a bőrpír, kellemetlen tünete az égő-viszkető érzés az érintett területen. A leginkább allergén fémek közé tartozik a nikkel, amely a fentebb felsorolt tárgyak többségében megtalálható, így elég nehéz elkerülni a vele való mindennapos találkozást.

A legegyszerűbb megoldás: minél inkább le kell szűkíteni a kockázat lehetőségeit, azaz amennyire csak lehet, el kell kerülni minden érintkezést az allergiát okozó fémeket tartalmazó tárgyakkal. Ennek egyik módja lehet például a fémtárgyak bőrrel érintkező felületének egy biológiailag semleges védő/szigetelő réteggel való bevonása. Úgy gondoltam, erre a feladatra alkalmas anyag lehet a kémiai ellenállásáról, biológiai indifferenciájáról jól ismert Teflon. Annak vizsgálata, alkalmazható-e az impulzus lézeres leválasztási eljárás Teflon védőréteg készítésére motiválta az első kísérletsorozatomat.

b) Teflon vékonyréteg impulzuslézeres leválasztása

A kísérletek során céltárgyként Teflon porból (Goodfellow, átlagos szemcseméret 6-9 μm) $4,7 \times 10^8$ Pa nyomáson préselt és 10 órán keresztül 250 °C-on utókezelt tablettákat használtam. Megpróbálkoztam 50 mikrométer vastagságú PTFE fólia (Goodfellow)

céltárgyként való alkalmazásával is, azonban azt tapasztaltam, hogy a besugárzás során belőle kilépő részecskék száma, méreteloszlása jelentősen függött a meglőtt felület aktuális állapotától, érdességétől [115]. Emiatt bizonytalanak voltak a vele készített vékonyrétegek paraméterei is. Így a továbbiakban kizárólag a Teflon porból előállított pelleteket alkalmaztam. A PTFE tabletta felületére fókuszáltam az ArF excimer lézer ($\lambda=193$ nm, FWHM=20 ns) nyalábját. A besugárzott terület $0,9 \text{ mm}^2$, az alkalmazott energiasűrűség $1,6\text{--}10 \text{ J/cm}^2$, a lézer frekvenciája 2 Hz volt. A céltárgy-szubsztrát távolság 3 cm , a vákuumkamrában a nyomás $4 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ volt, a szubsztrát hőmérsékletét 27 és $250 \text{ }^\circ\text{C}$ között változtattam. A kísérletsorozat folyamán a Teflon vékonyrétegeket KBr, üveg, 14 karátos arany (Au: 58,5%; Cu: 19,75%; Ni: 14,69%; Zn: 7,06%) és ékszerezüst (Ag: 92,5%; Cu: 7,5%) hordozókra választottam le.

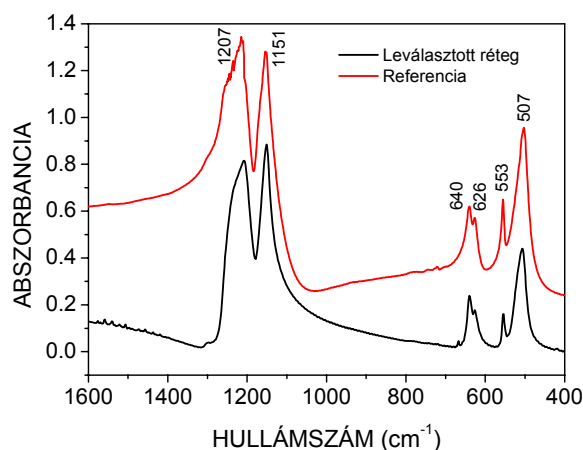
A leválasztott Teflon vékonyrétegek sztöchiometriai vizsgálatai Biorad FTS-65 IR spektroszkóppal (FTIR) és VG Microtech XR3E2 röntgendiffrakciós spektroszkóppal (XPS) készültek. A morfológiai vizsgálatok során egy Nikon optikai mikroszkópot, egy TopoMetrix 2000 atomi erő mikroszkópot (AFM) és egy Hitachi S2400 pásztázó elektron mikroszkópot (SEM) használtam, a rétegek vastagságát egy Taylor-Hobson Form Talysurf profilométerrel határoztuk meg a BME Atomfizika Tanszékén. A rétegek mechanikai vizsgálatait egy Shimadzu DUH-202 mikrokeményiség mérő készülékkel végeztük.

c) A vékonyrétegek kémiai összetételének vizsgálata

Első lépésként nyilvánvalóan azt kellett megállapítanom, a Teflon tabletta excimer lézeres besugárzása során leválasztott réteg kémiai összetétele mely paraméterek esetén egyezik meg a céltárgyával, azaz a kísérletek során valóban Teflon vékonyréteget állítottam-e elő. A különböző szubsztrát-hőmérsékletek mellett előállított vékonyrétegekről a szabad szemmel történt megfigyeléseim azt mutatták, hogy a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ -on készített réteg fehér, míg a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ -on sárgás, és a szobahőmérsékleten ($27 \text{ }^\circ\text{C}$) előállított barnás színű volt. Az elszíneződés valószínűsíthető oka a fluorhiány [89], ezért a továbbiakban csak a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ -on előállított minták kémiai összetételét vizsgáltam.

Az FTIR vizsgálatokhoz vékonyrétegeket választottam le KBr porból préselt tablettákra (az alkalmazott szubsztrát hőmérséklet $250 \text{ }^\circ\text{C}$) és felvettem az IR spektrumukat ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, 2 cm^{-1} felbontással). A vizsgált energiasűrűség tartományon nem volt megfigyelhető eltérés közöttük. A IV.2. ábra mutatja a referencia minta és a 9 J/cm^2 energiasűrűséggel leválasztott réteg IR spektrumát, melyek egyezők voltak, azaz sikerült

valóban politetrafluoroetilén vékonyréteget építenem a kísérletsorozat során az alkalmazott leválasztási körülmények között. Az ábrán megfigyelhetők a $-\text{CF}_2-$ csoport abszorpciós csúcsai: 1207 és 1151 cm^{-1} -nél az aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgések, 640 és 626 cm^{-1} -nél a C – C kötések vegyérték- és deformációs rezgések, végül 553 és 507 cm^{-1} -nél pedig a PTFE bólogató szimmetrikus illetve kaszáló aszimmetrikus deformációs rezgéseinek megfelelő csúcsok láthatóak [116].



IV.2. ábra A referencia minta és a 9 J/cm² energiasűrűséggel KBr tablettára leválasztott réteg IR spektruma

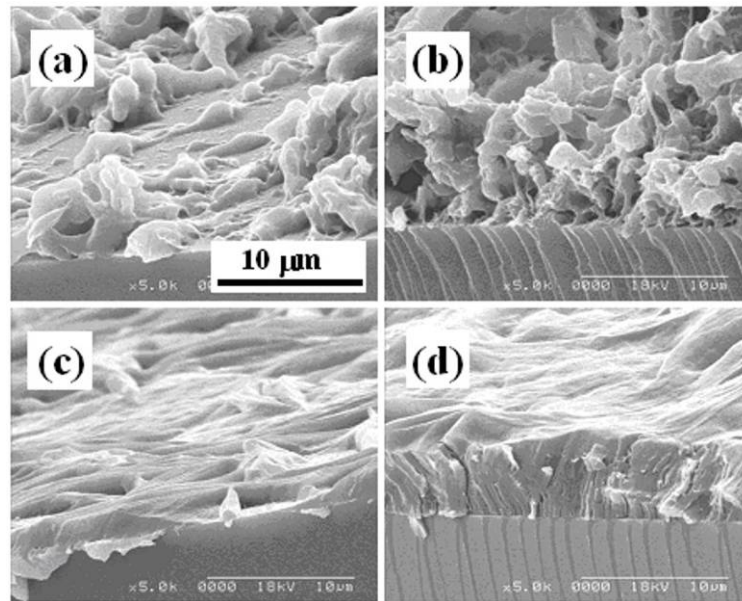
Ellenőrzésképpen a mintákról XPS spektrumok is készültek a C és F csúcsok környékén. A kiértékelés során megállapítottam, hogy a $-\text{CF}-$ és $-\text{CF}_3-$ csoportokhoz tartozó csúcsok intenzitása elhanyagolható a $-\text{CF}_2-$ csúcsok intenzitásához képest. A spektrumokon ugyanakkor grafit jelenlétére utaló csúcsok sem figyelhetők meg, ami a PTFE elszenesedésére utalhatna az utókezelés alatt. A fluor – szén arányra 2-höz igen közel álló érték adódott. Mindez összhangban áll az IR spektrumok által mutatott eredményekkel [117].

d) Morfológiai vizsgálatok

A kémiai összetétel vizsgálat után azt tanulmányoztam, milyen struktúrájuk az általam elkészített polimer filmek. Teflon vékonyrétegeket választottam le üveg hordozókra 27, 150 és 250 °C szubsztrát-hőmérsékletek mellett, miközben a besugárzás energiasűrűségét 1,6 – 10 J/cm² tartományon változtattam. A lézerimpulzusok száma minden esetben 10000 volt.

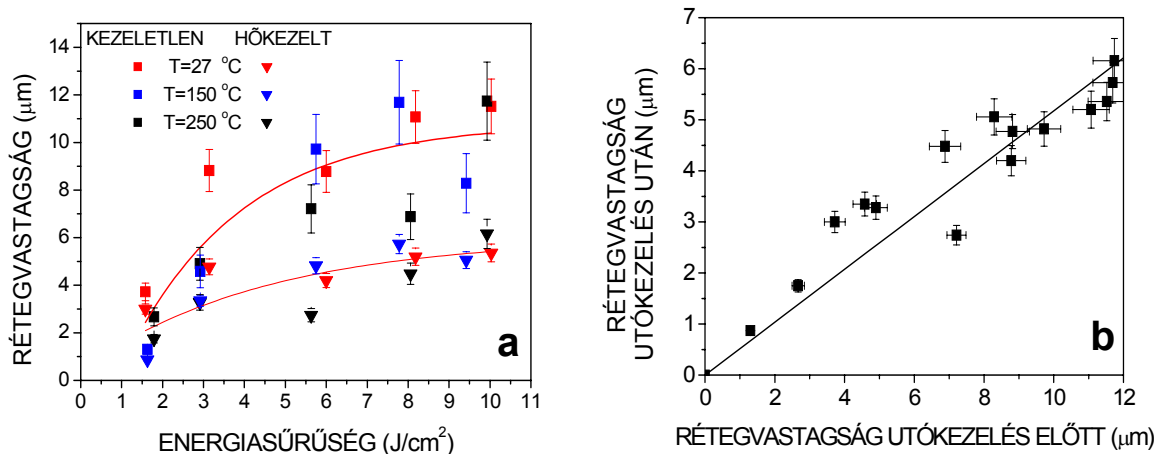
Az elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy kis energiasűrűségek (pl. 1,8 J/cm²) esetén a szubsztráton nem jött létre egységes, összefüggő vékonyréteg még 10000 impulzus után sem, csak egymástól elkülönült klaszterekbe tömörült részecskék voltak megfigyelhetők. Ezzel ellentétben 8,2 J/cm²-es energiasűrűség esetén már összefüggő

vékonyréteg borította a hordozót. A megfigyelhető struktúra szivacszerű volt, mely mikronos mérettartományba eső részecskékből állt. Nyilvánvaló volt, hogy ezek a rétegek ebben a formában nem lehetnek alkalmasak védőréteg feladat ellátására. A rétegek struktúrájának megfelelő átalakítása érdekében az elkészített rétegeket hőkezelttem. Levegőn 500 °C-ra fűtöttem fel őket 30 percig, majd 1 °C/perces sebességgel hűtöttem le szobahőmérsékletre. A vékonyrétegek keresztmetszeteiről készített képeken jól látható függőleges szerkezetük (IV.3. ábra). Megfigyelhető, hogy a 8,2 J/cm² energiasűrűség mellett leválasztott vékonyréteg az utókezelés hatására kb. 5 µm vastagságú, meglehetősen masszív és tömör réteggé alakult, korábbi szivacsos szerkezete az utókezelés hatására rostszerűvé, szálkássá vált (IV.3.d ábra).



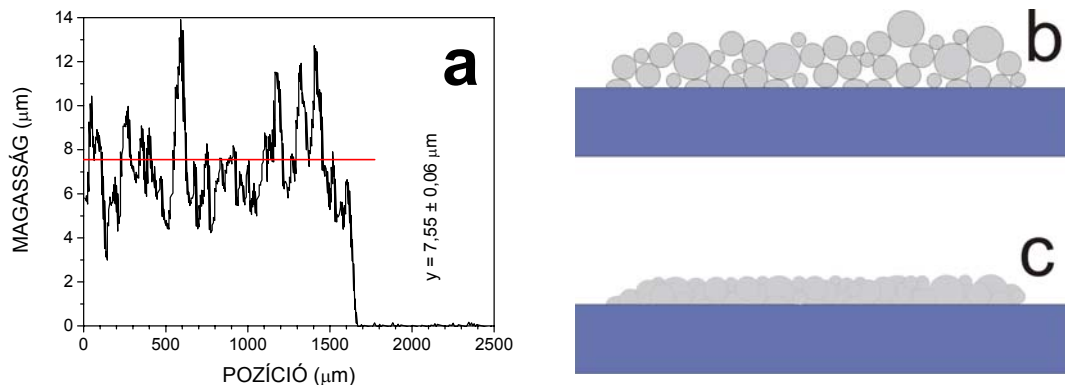
IV.3. ábra Teflon vékonyrétegek keresztmetszeti képei. Az (a, b) minták utókezelés nélkül, (c, d) 500 °C-os utókezeléssel, (a, c) 1,8 J/cm², (b, d) 8,2 J/cm² energiasűrűséggel készültek. A szubsztrát-hőmérséklet 250 °C volt.

A IV.4.a ábrán látható a leválasztott vékonyrétegek vastagságának függése a szubsztrát-hőmérséklettől és az alkalmazott energiasűrűségtől. Megfigyelhető továbbá a kifűtés rétegvastagságra gyakorolt hatása is. Méréseim szerint a rétegek átlagos vastagsága és a szubsztrát-hőmérséklet között nem mutatható ki összefüggés az általam vizsgált tartományon. Ugyanakkor az átlagos rétegvastagság növekszik az energiasűrűség növelésével. Ez a növekedés alacsonyabb energiasűrűségeknél (1,6-4 J/cm²) jelentősebb, magasabb értékeknél kevésbé. A IV.4.b ábrán pedig az figyelhető meg, hogy a hőkezelés hatására a rétegvastagság kb. felére csökken a tömörödés, átstrukturálódás következtében [117].



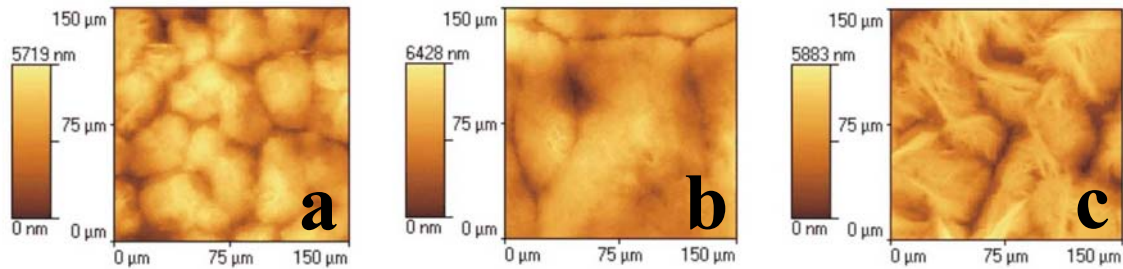
IV.4. ábra A leválasztott vékonyrétegek vastagságának energiasűrűség-függése (27 , 150 és 250°C -os hordozók esetén) hőkezelés előtt és után (a), és az utókezelés hatása a rétegvastagságra (b).

Itt tisztázni kell, a megfigyelt, több mikrométeres szemcsékből álló minták esetében mit is értettem én rétegvastagság alatt. Ez tulajdonképpen egyfajta átlagérték, melyet úgy kaptam, hogy a profilométer által a vizsgált felületről adott lokális magasságokat kiátlagoltam, s ezt az értéket viszonyítottam a hordozó felületéhez (IV.5.a ábra). A megfigyelt nagyfokú érdekesség miatt igen nagy 7-15 %-os szórást tapasztaltam a mérések során. A kifűtés előtti esetekben a vastagság meghatározásánál nem tudtam figyelembe venni a réteg szivacsos voltát, melynek eredményeképpen nagyobb vastagságot érzékeltem, mint amennyi a leválasztott anyagmennyiségből valójában következett (IV.5.b ábra). A megfelelő hőkezelés ($>330^\circ\text{C}$) utáni esetekben ezek a problémák már nem léptek fel, mivel a réteget alkotó szemcsék összeolvadtak, a rétegek kisimultak, összetömörödtek, a „holt” térfogatok megszűntek (IV.5.c ábra).



IV.5. ábra A rétegvastagság meghatározása (a), illetve a rétegek szivacsos szerkezete a hőkezelés előtt (b) és után (c).

A következő kísérlet során azt vizsgáltam, hogy az utókezelési hőmérséklet hogyan befolyásolja a kialakuló felszín minőségét és morfológiáját. Ezen vizsgálatok elvégzéséhez a vékonyrétegek elkészítése során $7,7 \text{ J/cm}^2$ -es energiasűrűségű besugárzást alkalmaztam. A minták utókezelését különböző hőmérsékleteken végeztem, kevéssel a PTFE olvadási pontja (327°C , [72]) alatt, illetve a felett (320°C , 360°C , 420°C , és 500°C). A kifűtés 30 percig tartott, amit 1°C/perces sebességű hűtés követett. Az elkészült rétegeket megvizsgáltam AFM-mel (IV.6. ábra).



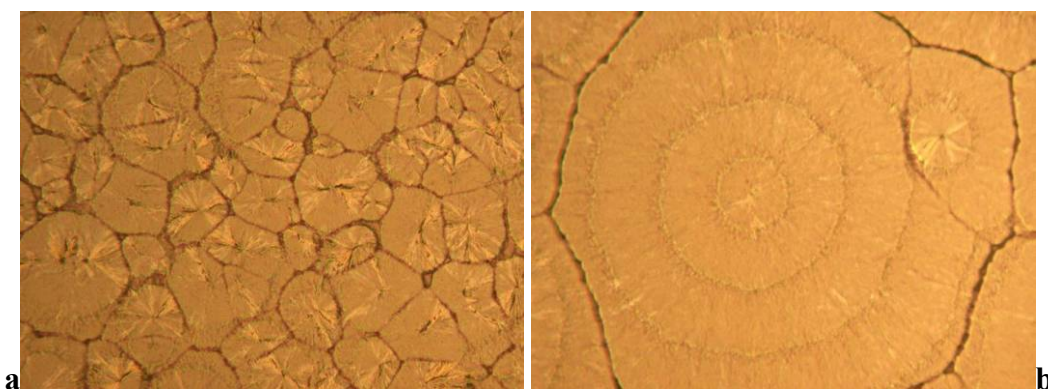
IV.6. ábra A leválasztott és hőkezelt Teflon vékonyrétegek atomi erő mikroszkópos képe. Az alkalmazott hőmérsékletek: 320°C , 360°C és 500°C .

A hőkezelés előtti mintákról az AFM nem tudott képeket készíteni, mivel felületük érdessége túl nagy volt, így sajnos nem lehet pontosan nyomon követni a változást. Azonban megfigyelhető, hogy 320°C -os kezelés hatására néhányszor $10 \mu\text{m}$ méretű szemcsék jelennek meg, míg a hőkezelés előtt optikai mikroszkóppal megfigyelt kisebb részecskék teljesen eltűntek (IV.6.a ábra). Feltehető, hogy a melegítés hatására bekövetkező lágyulás eredményeképpen a kisebb szemcsék nagyobb méretű klaszterekké formálódtak. Ha növeljük a hőmérsékletet 360°C -ra, megközelítőleg $100 \mu\text{m}$ kiterjedésű, néhány mikrométer vastag kristályos lemezek jönnek létre (IV.6.b ábra). 500°C -ra emelve a hőmérsékletet, szálkás struktúrájú felület keletkezik (IV.6.c ábra). Ehhez nagyon hasonló volt a 420°C -on kezelt minta felülete.

Ez az eredmény a következőképpen magyarázható. A hőmérsékletemelkedés hatására a hosszú PTFE láncok ($\sim 10^5$ monomer) rövidebb darabokra hasadnak, ezáltal lehetővé válik a molekulák újrarendeződése, kristályosodása és így a felületen krisztalitok jelennek meg. Az olvadáspont közelében a Teflon nagy viszkozitása azonban meggátolja, hogy a megolvadt szemcsék teljesen összefolyjanak. Azonban amikor a hőmérséklet 360°C fölé emelkedik, akkor a viszkozitás nagysága jelentős mértékben lecsökken, és így kialakulhat a simább és sokkal tömörebb vékonyréteg [117].

Tapasztalataim szerint a leválasztott Teflon rétegek adott hőmérsékletű utókezelése esetén a fűtési/hűtési folyamat, ill. sebesség változtatásával befolyásolni lehet a kialakuló

struktúrát. Példaképpen a IV.7. ábra 360 °C-on, 30 percen át utókezelt PTFE filmek optikai mikroszkópos képeit mutatja. A két képen látható rétegek között a hűtés folyamatában van különbség, mely az a) esetben 1 °C/perc hűtési sebességű folyamatos hűtést jelentett 250 °C-ig. A b) esetben a réteget 1 °C/perc sebességgel hűtöttük 320 °C-ig, ott 30 percig várakoztattuk, majd ezt követően folytattuk a hűtést ugyanezzel a sebességgel 250 °C-ig. Mint az ábrán is látható, ez utóbbi esetben egy, addig az irodalomban nem látott struktúrájú, kb. 600 mikrométeres átmérőjű, koncentrikus köröket tartalmazó kristályos lapkákból álló filmet kaptam [118].



IV.7. ábra 360 °C-on, 30 percen át utókezelt, különbözőképpen lehűtött PTFE filmek optikai mikroszkópos képei.

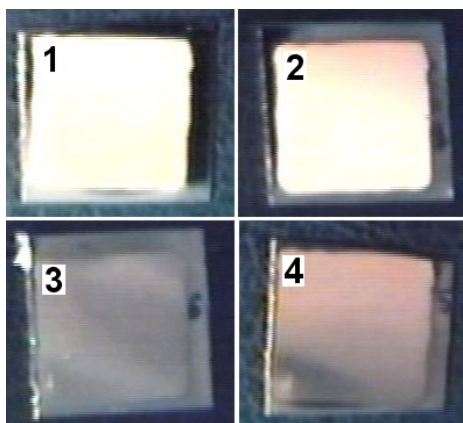
Speciális esetekben azonban éppen a szivacsos szerkezet az előnyösebb. Például abban az esetben, amikor olyan rétegre van szükség, mely elektromosan szigetelő, viszont lehetővé teszi a réteg két oldala közötti gázátáramlást. Ez többféle gáz detektálására alkalmas szenzor szendvics esetén lehet fontos tulajdonság, melyben az érzékelő rétegeket elektromosan el kell választani egymástól, miközben a gázátáramlást biztosítani kell közöttük. Vegyész kollégáimmal szén-nanocső alapú érzékelő rétegek Teflon filmmel való bevonására végeztünk sikeres kísérleteket [119].

e) Teflon védőréteg kialakítása fém felületeken

Az eddigi vizsgálatok azért voltak szükségesek, hogy eredményeik alapján megfelelő tulajdonságokkal rendelkező Teflon védőréteget állíthassak elő az allergén célfelületeken. A következő kísérletekben a fő célkitűzésnek megfelelően Teflon réteggel vontam be fém szubsztrátok felületét a korábbiakban legmegfelelőbbnek talált leválasztási paraméterek mellett ($F \sim 7,5 \text{ J/cm}^2$, $T_s = 250 \text{ °C}$, impulzusok száma 10000). A hordozók most már a leginkább elterjedt, legfontosabb allergén anyagokból (14 karátos aranyból (Au: 58,5%; Cu:

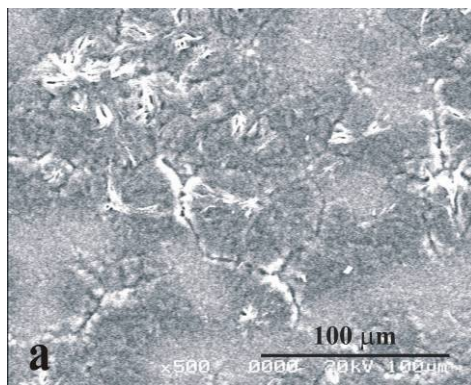
19,75%; Ni: 14,69%; Zn: 7,06%) és ékszerezüstből (Ag: 92,5%; Cu: 7,5%)) készült lemezek voltak. Azért választottam ezeket az anyagokat, mert velük, illetve a bennük levő különböző fémekkel igen sűrűn kerülhetünk kapcsolatba hétköznapi életünk során.

Az így elkészült rétegek vastagsága a profilométeres vizsgálatok szerint $\sim 10\ \mu\text{m}$ volt, míg a hőkezelés után újból elvégzett mérések szerint ez az érték $\sim 5\ \mu\text{m}$ lett, ami a hőkezelés során bekövetkező szerkezeti változásoknak a következménye. A IV.8. ábrán arany hordozóra leválasztott rétegek láthatóak, az (1)-es minta utókezelés nélkül, míg a (2)-(4) minták rendre 320, 360 és 500 °C-os hőkezelés után.



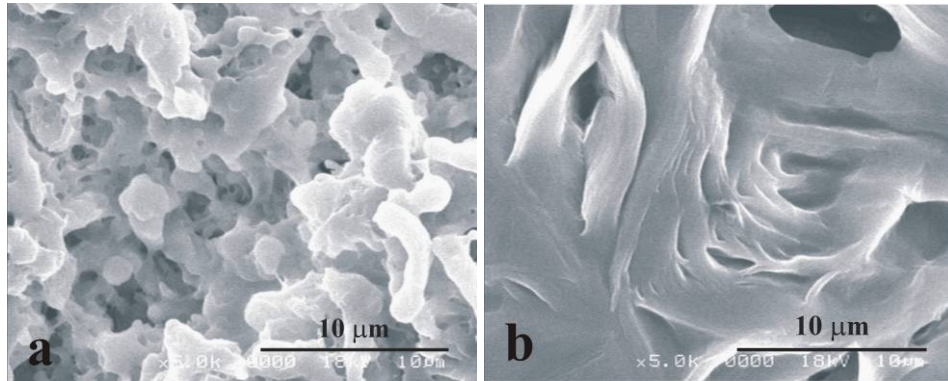
IV.8. ábra A PTFE vékonyréteggel bevont 2 cm széles aranylemezek hőkezelés után. Az utókezelési hőmérséklet 320 (2), 360 (3) és 500 °C (4) volt. Az első minta (1) utókezelés nélkül látható az összehasonlíthatóság érdekében.

Már szabad szemmel történt megfigyelés után is megállapítható volt, hogy a (2)-es minta esetén nem következett be jelentős változás az utókezelés során. A 360 °C-os kezeléssel közel átlátszó réteget sikerült előállítani (3), míg a 360 °C-nál nagyobb hőmérsékleten kezelt minták barnásaknak tűntek (4). Az elektronmikroszkópos vizsgálat ebben az esetben is kimutatta, hogy a réteg igen tömör, s kristály-szerű struktúrákból áll (IV.9. ábra).



IV.9. ábra A 360 °C-on utókezelt Teflon réteg pásztázó elektronmikroszkópos képe.

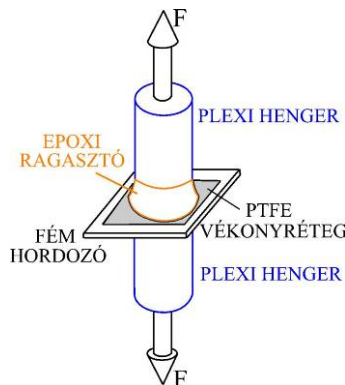
A hasonló körülmények között előállított és 320, valamint 420 °C-on utókezelt rétegek pásztázó elektronmikroszkópos képei a IV.10. ábrán láthatóak. 320 °C-nál a minta felülete szemcsés (a), míg 420 °C-on és afelett kezelt minták szerkezete arra utal, hogy a kezelés során a réteg megolvadt (b). Hasonló eredményeket értem el az ékszerezüst hordozókra leválasztott rétegek esetén is [120].



IV.10. ábra: 320 (a) és 420 °C-on (b) utókezelt PTFE vékonyrétegek elektronmikroszkópos képei.

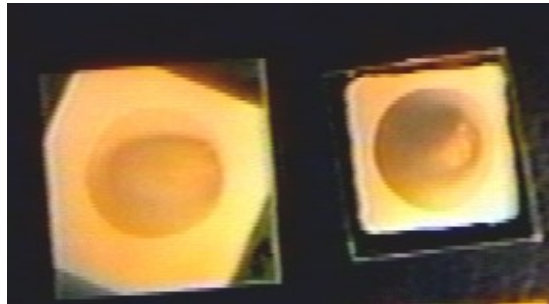
f) A rétegek tapadásának, keménységének vizsgálata

A Teflon védőréteg megbízható és eredményes alkalmazásának szempontjából nézve nagyon fontos tényező, hogy a bevonatok mennyire tapadnak a különböző hordozókhoz, esetünkben az arany és ezüst lemezekhez. Hiszen nyilvánvaló, hogy az a PTFE vékonyréteg, amelyik könnyen leválik, lekopik vagy lepattogzik kis erők vagy dörzsölés, súrlódás hatására, alkalmatlan a célkitűzésben említett védőréteg feladatra. Emiatt kvantitatív vizsgálatot végeztem, hogy meghatározhatók legyenek a különböző hőmérsékleteken utókezelt Teflon vékonyrétegek és a fém hordozók közötti tapadási erők. A kísérletek során a mintákat két plexi henger közé ragasztottam UVRapid 20 kétkomponensű epoxi ragasztóval (IV.11. ábra).



IV.11. ábra Kísérleti elrendezés a Teflon védőrétegek hordozókhoz való tapadásának vizsgálatához.

A ragasztást először lehetetlenné tette, hogy a Teflon közismerten hidrofób és oleofób (az aranylemezen lévő PTFE vékonyréteg és víz közötti nedvesedési határszöget megmérve 112° -ot kaptam), így nem tapadt meg rajta a ragasztó. Azonban egy korábbi, Teflon fólia lézeres felületkémiail módosítására vonatkozó kísérletsorozat eredményeit sikerült erre az esetre is aktualizálnom, s így sikerült a Teflon réteg adhézióját a kívánt mértékben megnövelnem. Az ott kidolgozott módszer adott esetre aktualizált változatát alkalmaztam: a rétegeket besugároztam az excimer lézer nyalábjával, igen kis ($<1 \text{ mJ/cm}^2$) energiasűrűségen, fotoreagens anyag gőzének (1,2-diaminoetán) jelenlétében. Ez a kezelés a vékonyréteg felületén kémiai változást eredményezett: amin csoportok épültek be a PTFE láncba [82], melynek következtében a Teflon réteg és a plexi rúd között a ragaszthatóság drasztikusan megnőtt [121]. Öt nap kötési idő után az egyes hengerpárokat fokozatosan növekvő erővel húzni kezdtem ellentétes irányba, s megmértem, mekkora erő hatására lehet elszakítani a védőréteget a hordozótól (IV.12. ábra). Ezt az erőt elosztva a ragasztási felülettel, kapjuk a tapadási szilárdságot. Az ábrán jól látható, hogy a réteg csak a ragasztás helyén vált el a fémlemezről.



IV.12. ábra Amikor a szakító erő eléri a Teflon réteg és a hordozó közötti tapadási erőt, a ragasztott réteg leválik a hordozóról.

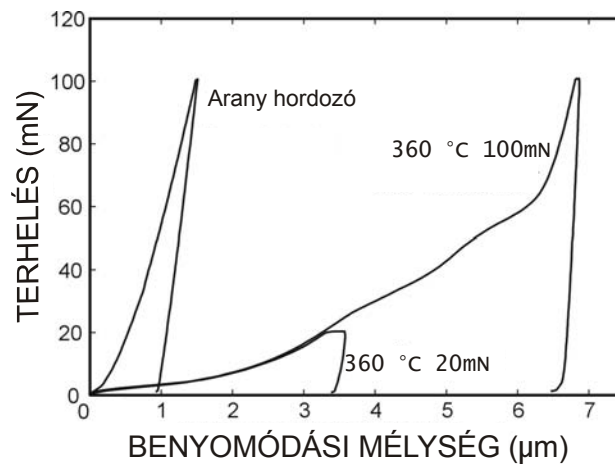
Azt tapasztaltam, hogy ennek értéke meghaladhatja akár az 1-4 MPa-t – az utókezelés hőmérsékletének függvényében – mind az arany, mind pedig az ezüst minták esetében. A legalacsonyabb értékeket (kb. 1 MPa) az utókezelés nélkül ragasztott mintáknál értem el, míg a legmagasabbakat (3,5 – 4 MPa) 360°C -os kezelés után mértem. Ez annak a következménye, hogy a hőkezelés hatására megváltozik a vékonyréteg szerkezete, illetve a réteg és a hordozó közötti tapadás [120].

Az előállított Teflon rétegek keménységének vizsgálata szintén fontos adatokkal járul hozzá a leválasztott polimer filmek jellemzéséhez. Ebben az esetben is nyilvánvaló, hogy ahhoz, hogy ezeket védőréteggént tudjuk alkalmazni, a mechanikai behatásokkal szemben megfelelően ellenállóaknak, keményeknek kell lenniük. Mivel ezek a rétegek meglehetősen

vékonyak, és nem különíthetők el a hordozóktól, ezért a keménységmérést Nagy Piroska kollégámmal egy Shimadzu DUH-202 ultra-mikrokeménység-mérő készülékkel végeztük el arany lemezekre leválasztott, utókezelt és kezeletlen PTFE rétegeken. Az utókezelés során 360, 420 és 500 °C-os hőmérsékleteket alkalmaztam. A mérés során egy Vickers-piramis mérőfej nyomódott a minta felületébe, egyenletesen növekvő terhelés mellett egy beállított maximális terhelésig, majd egy bizonyos idő múlva a piramis ugyanazzal a sebességgel felemelkedett. Tiszta arany hordozón és befedett mintákon felvett benyomódási görbék láthatóak a IV.13. ábrán. A maximális terhelés 20 illetve 100 mN volt, a terhelési sebesség 13,24 mN/s, a maximális terhelés 1 s-ig állott fenn. A görbéken megfigyelhető, hogy a 20 mN-os terhelés mellett végzett mérés a réteget jellemzi, míg a 100 mN-os az egész mintát (arany+Teflon), mivel a görbe menete egy bizonyos mélység (kb. 6 mikrométer, mely megfelel a réteg vastagságának) után megegyezik az arany esetében felvettével. A Teflon rétegre jellemző dinamikus Vickers keménység a maximális terhelésből és a maximális behatolási mélységből határozható meg a következő formula alapján:

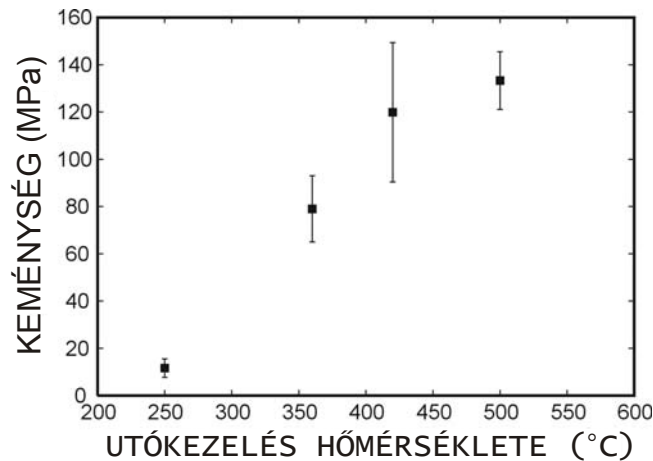
$$DHV = 38.584P / d^2,$$

ahol a P terhelést mN-ban, a d benyomódási mélységet μm -ben és a DHV -t MPa-ban mérjük.



IV.13. ábra Jellegzetes benyomódási görbék arany lemezen és Teflon vékonyréteggel borított arany lemezen. A maximális terhelés 20 és 100 mN, a terhelési sebesség 13,24 mN/s volt.

A IV.14. ábrán a dinamikus Vickers keménység látható az utókezelés hőmérsékletének függvényében. Mint látható, a keménység drasztikusan növekszik a hőmérséklet növekedésével. A keményedést a bevont minta korábban már tárgyalt szerkezeti változásai (kristályosodás) okozzák [120].



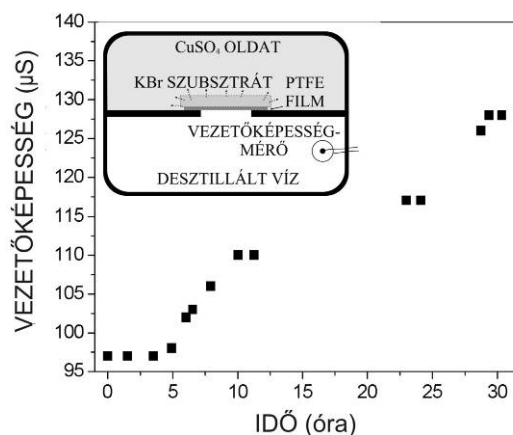
IV.14. ábra A dinamikus keménység értékek az utókezelés hőmérsékletének függvényében.

Látható, hogy a néhány mikrométer vastag vékonyrétegeim esetén mért Vickers keménység értékek nem sokkal kisebbek, mint a tömbi anyagra az irodalomban talált adat, mely 23 °C-on mérve 355 MPa volt [72].

g) Kémiai szigetelőkéesség vizsgálata

Szintén fontos kérdés, hogy vajon a Teflon rétegek ténylegesen elszigetelik-e a befedett hordozót a környezeti, kémiai behatások elől. Ezek szerint azt kell megvizsgálni, hogy a különböző kémiai elemek, atomok, ionok, molekulák át tudnak-e jutni a PTFE rétegen. Ennek kimutatására végeztem el a következő demonstrációs kísérletet. Először is egy új Teflon vékonyréteget választottam le KBr hordozóra 20000 excimer lézer impulzussal. A réteg vastagsága a 360 °C-os kezelés után 12 µm-nek adódott. (A hőkezelés nélküli és a 320 °C-on hőkezelt, szivacsos struktúrájú rétegek áteresztőek voltak.) Az elkészített mintát egy műanyag edényt kettéosztó plexi falon lévő lyukra ragasztottam. Az edény egyik felébe desztillált vizet töltöttem, míg a másik (szobahőmérsékleten) telített CuSO₄ oldatot tartalmazott (IV.15. ábra, kis kép). A KBr szubsztrát gyorsan feloldódott az oldatban, így a két részt csak a Teflon vékonyréteg választotta el egymástól. A kísérlet közben egy Radelkis vezetőképesség-mérő készülékkel folyamatosan nyomon követtem a desztillált víz vezetőképességét. Mivel ennek értéke rendkívül érzékeny az ionok jelenlétére, így amint Cu²⁺ illetve SO₄²⁻ gyökök jelennek meg a desztillált vízben, szinte azonnal érzékeltetni is lehet ezeket. A réz-szulfát oldat és a desztillált víz vezetőképességében lévő nagy különbség (35 mS illetve 97 µS) növelte a mérés érzékenységét. Úgy találtam, hogy a vezetőképesség nem változott érzékelhető mértékben az első 5 óra alatt. Körülbelül 5 óra után egy kis növekedést tapasztaltam (IV.15. ábra). 30 óra

alatt a desztillált víz vezetőképességének változása még nem érte el a 30%-ot, ami a CuSO_4 oldat vezetőképességének kevesebb, mint 0,4%-a. Ez pedig azt jelenti, hogy az allergiát okozó fém tárgyak kémiai izolálására a Teflon védőréteg viszonylag jó hatásfokkal alkalmazható [120].



IV.15. ábra A próbafolyadék (desztillált víz) vezetőképességének változása az idő függvényében. A méréshez használt elrendezés a kis képen látható.

Kísérleteim során először tettem javaslatot PLD-vel előállított Teflon védőbevonat alkalmazására allergén tárgyak elszigetelése céljából. Az eljárással megfelelő kísérleti paraméterek mellett kompakt, összefüggő, hajszálrepedésektől mentes, a szubsztráthoz jól tapadó, megfelelő, néhány mikrométer vastagságú Teflon vékonyrétegeket választottam le allergén tárgyak (pl. 14 karátos arany, ékszerszüst) felületére. A tapadási és a kémiai szigetelőképeségi kísérleteim bizonyították, hogy a feltételezésnek megfelelően ezen vékonyrétegek alkalmasak lehetnek az emberi szövet és az allergén fémek egymástól való elszigetelésére és ezáltal az allergiás reakciók elkerülésére.

KEZELÉSI HŐMÉRSÉKLET [$^{\circ}\text{C}$]	NEM VOLT UTÓKEZELÉS	320	360	500
Szín	Fehér x	Fehér x	Átlátszó ☹	Barnás x
Rétegalkotók	<10 μm -es szemcsék x	~10 μm -es klaszterek x	~100 μm -es laterális méretű lapkák ☹	Szálkás olvadék rostok x
Térbeli szerkezet	Szivacsos x	Szivacsos x	Tömör ☹	Tömör ☹
Tapadási szilárdság [MPa]	1 x	1 x	3,5-4 ☹	3,2 ☹
Keményység [MPa]	15 x	Nincs adat ?	80 x ☹	132 ☹
Áteresztőképesség	Azonnal átenged x	Azonnal átenged x	Órákig szigetel ☹	Nincs adat ?

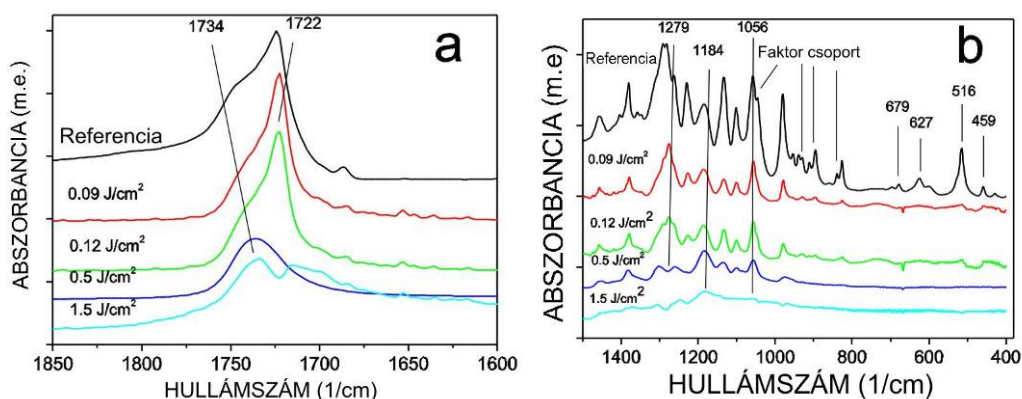
2. táblázat

A 2. táblázat eredményei azt mutatják, hogy összességében a 360 °C-on hőkezelt, kb. 10-20 mikrométer vastag rétegek felelnek meg legjobban a védőréteggént való felhasználhatóság iránti kémiai, mechanikai, strukturális és esztétikai követelményeknek.

Meg kell azonban jegyezem, hogy habár a 360 fokon hőkezelt Teflon rétegek közel átlátszóak, ékszerek felületére leválasztva mégis csökkentik azok természetes fényét, az általuk nyújtott esztétikai élményt. Ezért az ideális csak az emberi testtel érintkező felületek (óra hátlapja, medál hátoldala, fülbevalók csatja, stb.) védőréteggel történő bevonása lehet. Az is nyilvánvaló, hogy a védőréteg és a fém hordozó felület közötti tapadás meg sem közelíti a Teflon tömb szakító szilárdságát, ezért ezek nem alkalmazhatók jelentősebb erőhatásnak kitett felületeken.

IV.1.3. Polihidroxibutirát vékonyrétegek impulzuslézeres leválasztása

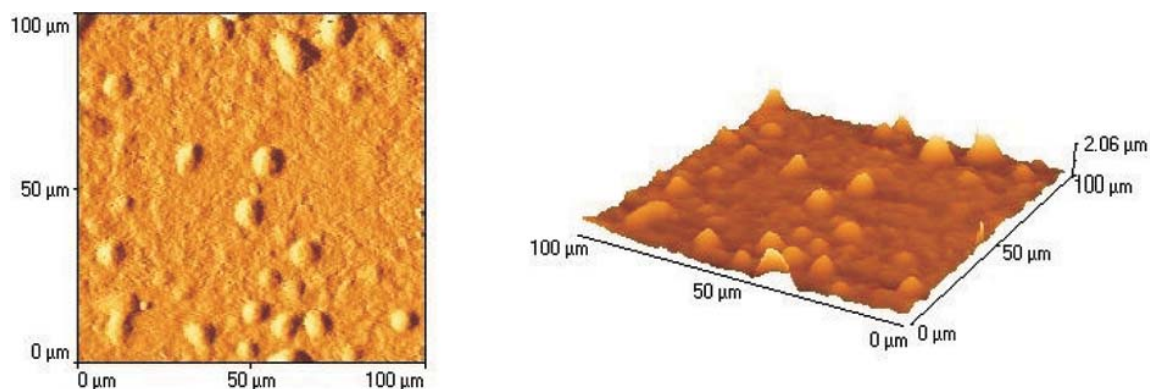
Alábbi kísérleteimben most is ArF excimer lézert alkalmazva választottam le vékonyrétegeket PHB (Goodfellow) porból 440 MPa nyomáson préselt tablettákból. A besugárzott felület 0.8 mm² volt, az alkalmazott energiasűrűség értékeket 0.05, és 1.5 J/cm² között változtattam. A céltárgy-szubsztrát távolság 4 cm, a PLD kamrában a nyomás $4,4 \times 10^{-3}$ Pa volt, a szubsztrátot szobahőmérsékleten tartottam. Első lépésként a spektroszkópai vizsgálatokhoz KBr tablettákra történt a leválasztás.



IV.16. ábra: Az eredeti PHB és a leválasztott filmek FTIR spektruma különböző energiasűrűségek alkalmazása esetén. Az 1850-1600 cm⁻¹ tartományban található a legjellemzőbb sáv (C=O nyújtási rezgés) (a), míg alacsonyabb hullámszám értékeknél az észter csoport C-O-C(=O)-C részének abszorpciós és a fizikai állapotról számot adó sávok láthatók (b).

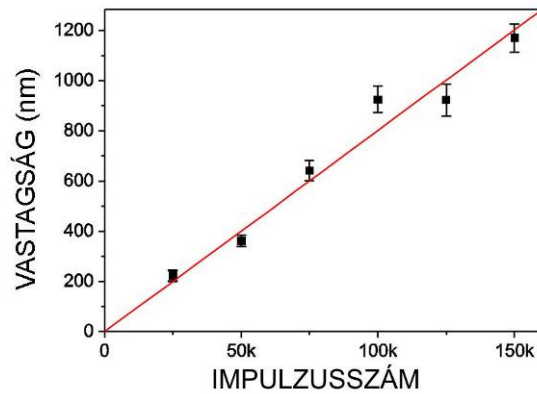
A IV.16. ábra mutatja az eredeti PHB minta és a belőle leválasztott vékonyrétegek FTIR spektrumát különböző energiasűrűségek mellett. Látható, hogy a C=O nyújtási rezgéshez tartozó sáv a kb. $0,12 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűség értékig megtalálható a filmek spektrumaiban is, felette viszont jelentős torzulás figyelhető meg (IV.16.a ábra). A polimer lánc C-C, C-O sávjai, melyek számot adnak a lánc kémiai, fizikai állapotairól az $1300\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$ tartományban helyezkednek el (IV.16.b ábra). Ugyanitt található még az észter csoport C-O-C(=O)-C részének megfelelő három sáv is [122]. A kiindulási anyag spektruma szemi-kristályos struktúrát mutat, míg a leválasztott filmeké többé-kevésbé amorf szerkezetet jelez ($1100\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$ tartománybeli csúcsok). A spektrumok vizsgálata alapján megállapítottam, hogy az általam tanulmányozott energiasűrűség tartományból a $0,12 \text{ J/cm}^2$ -nél nem nagyobb értékek alkalmazása esetén kapunk sztöchiometrikus PHB vékonyrétegeket a PLD során [123].

A rétegek morfológiáját optikai és atomi erő mikroszkóppal vizsgáltam. Mint a IV.17. ábrán látható, egy viszonylag durva felületet kaptam, mikrométeres szemcsék beépülése figyelhető meg az összefüggő filmbe. Ezek maximális laterális mérete elérte a $30 \mu\text{m}$ -t is.



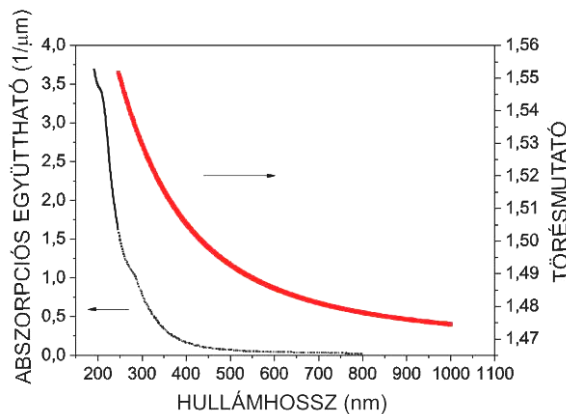
IV.17. ábra: A leválasztott PHB vékonyréteg atomi erő mikroszkópos képe ($F=0,12 \text{ J/cm}^2$)

A $0,12 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséggel készített rétegek vastagságának és optikai tulajdonságainak (a valós és a komplex törésmutatók, n és k) meghatározásához egy Woollam M-2000F spektroszkópiai ellipszométert alkalmaztunk Tóth Zsolt kollégámmal. A próbanyaláb hullámhosszát a $245\text{-}1000 \text{ nm}$, a beesési szöget a $45\text{-}65^\circ$ tartományokon változtattuk. A mért értékeket parametrikus Cauchy-modell szerint illesztettük. A IV.18. ábra mutatja a rétegvastagság – impulzusszám függvényt. A mérési pontokra illesztett egyenes meredeksége adja meg az átlagos leválasztási sebességet, amely $0,008 \text{ nm/impulzus}$ -nak adódott [123].



IV.18. ábra: A leválasztott PHB rétegek vastagságának impulzusszám függése. Az alkalmazott energiasűrűség $0,12 \text{ J/cm}^2$ volt. A mérési pontokra illesztett egyenes meredeksége adja meg az átlagos leválasztási sebességet, amely $0,008 \text{ nm/impulzus}$ -nak adódott.

Az ellipszométeres adatok alapján meg tudtuk határozni az elkészített PHB filmek törésmutatójának hullámhosszfüggését, mely tipikus csökkenést mutatott a vizsgált tartományon (IV.19. ábra). Kiszámítottuk a rétegek abszorpciós együtthatóját is a különböző hullámhosszakra, mely szintén ezen az ábrán látható. Ezek az adatok azért is jelentősek, mert velük kapcsolatban ezidáig irodalmi értékek nem álltak rendelkezésre.



IV.19. ábra: $0,12 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűség alkalmazásával leválasztott PHB rétegek törésmutatójának és abszorpciós együtthatójának hullámhosszfüggése.

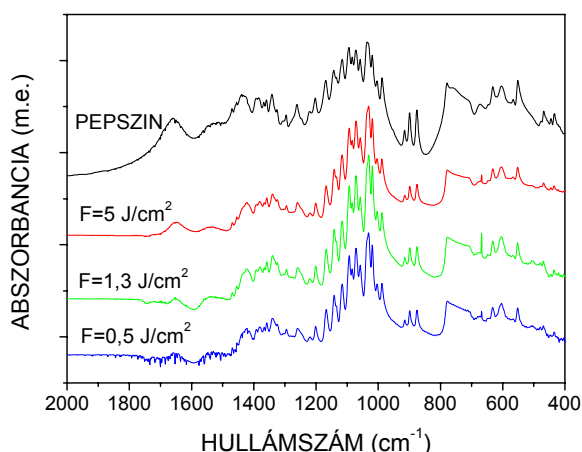
IV.1.4. Pepszin vékonyréteg előállítása

a) A leválasztott vékonyrétegek kémiai és felületi vizsgálata

Pepszin vékonyrétegeket az IV.1.1. fejezetben már bemutatott PLD rendszerrel készítettem. Céltárgynak 245 MPa nyomáson 1 percig préselt pepszin (FLUKA Chemika) tablettákat használtam, az abláláshoz ArF excimer lézert alkalmaztam ($\lambda=193 \text{ nm}$, 30 ns impulzushossz),

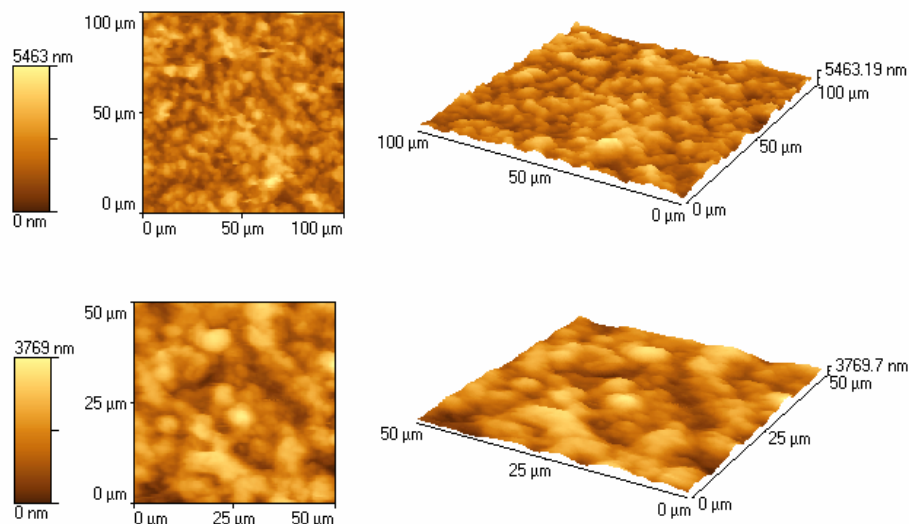
a besugárzott felület nagysága $1,7 \text{ mm}^2$ volt. Az energiasűrűséget $0,24$ és $5,1 \text{ J/cm}^2$ között, az impulzusszámot pedig 3300 és 16000 között változtattam. A céltárgy-szubsztrát távolság 4 cm , a kamrában a nyomás pedig $5 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ volt. Az IR spektroszkópiai vizsgálatokhoz szükséges minták esetén KBr, a morfológiai vizsgálatokhoz üveg szubsztrátot alkalmaztam. A leválasztott vékonyrétegek kémiai összetételét FT-IR spektrométerrel vizsgáltam a $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ tartományon, a morfológiai vizsgálatokhoz atomi-erő mikroszkópot alkalmaztam. A rétegek katalizáló képességét emésztési teszttel demonstráltam.

Az IR spektroszkópiai vizsgálatokhoz $0,24$; $0,5$; $0,8$; $1,3$ és $5,1 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűségeknél készítettem vékonyrétegeket. A IV.20. ábrán látható a pepszin meglehetősen komplex spektruma, amely az anyag szerkezetének bonyolultságára utal. Ezzel összehasonlítva a rétegek spektrumát, úgy találtam, hogy a $0,24 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséggel készített vékonyréteg kivételével mindegyik kémiai összetétele alapvetően megegyezik.



IV.20. ábra A pepszin és a PLD-vel készített pepszin vékonyrétegek infravörös spektruma.

Az $5,1 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséggel és 16000 impulzussal készült vékonyrétegről AFM-mel készített képek az IV.21. ábrán láthatók. A vékonyréteg felületén jól látszanak a pepszin szemcsék, melyek egy összefüggő, tömör réteget hoztak létre.

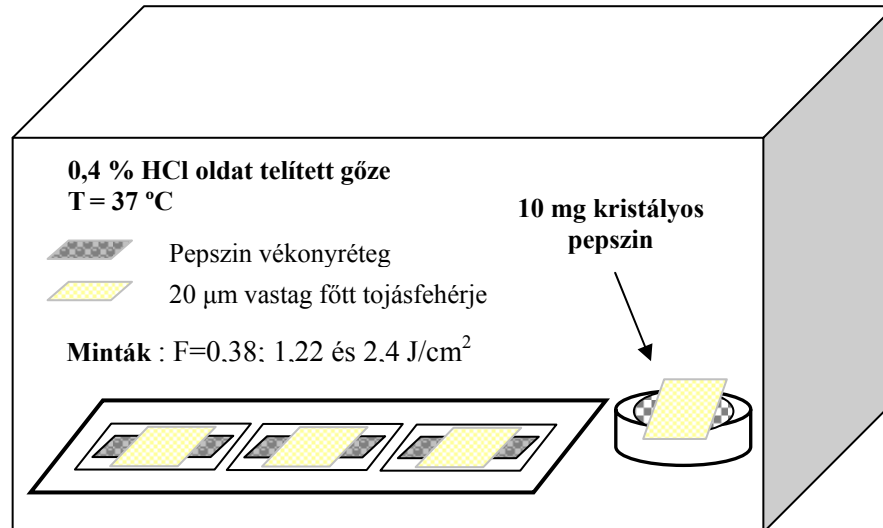


IV.21. ábra $F=5,1 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűségnél 16000 impulzussal leválasztott pepszin vékonyrétegről különböző nagyítással készített atomi-erő mikroszkópos képek.

b) Enzimaktivitási vizsgálat

A vékonyréteg növesztése során a pepszin molekuláiban olyan változások is végbe mehetnek, amelyek az infravörös abszorpciós spektrumban nem mutathatók ki egyértelműen. Az ilyen változások elronthatják a rétegek biológiai funkcionalitását, katalitikus képességét. Márpedig csak akkor beszélhetünk sikeres vékonyréteg növesztésről, ha ezek enzimatis hatása is megmarad. Ennek ellenőrzésére emésztési kísérletet végeztünk Dr. Nógrádi Antal orvos kollégámmal. Ehhez három mintát készítettem különböző, 0,38, 1,22 és $2,4 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűségekkel. A teszthez tojásfehérjét használtunk, mivel korábbi kísérletek kimutatták, hogy egyetlen gramm kristályos pepszin két óra alatt 50 kg főtt tojásfehérjét képes hidrolizálni. Az aktivitási vizsgálatot egy, a környezetétől elzárt kamrában végeztük (IV.22. ábra). Itt az emésztési folyamathoz legkedvezőbb feltételeket hoztuk létre. A kamrában állandó, az emberi testhőmérsékletnek megfelelő $T=37^\circ\text{C}$ hőmérséklet volt. A pepszin működésének beindulásához azonban szükség volt még a sósav jelenlétére is, ezért a kamrába, a pepszin emésztési mechanizmusának elengedhetetlen feltételeként, 0,4 %-os HCl oldatot párologtattunk, valamint egy 10 mg-os kristályos pepszin tablettát helyeztünk el kontrollanyagként. A pepszin vékonyrétegekre és a kontrolltablettára egyenként $20 \mu\text{m}$ vastagságú főtt tojásfehérje szeletet helyeztünk. 16 óra múlva azt tapasztaltuk, hogy a kristályos pepszin tablettáról és a három vizsgált minta közül kettőről eltűnt a tojásfehérje, vagyis ezeknél a pepszin rétegeknél lezajlott az emésztési folyamat. A vékonyrétegek,

amelyek megemésztették a tojásfehérjét 0,38 és 1,22 J/cm²-es energiasűrűség értékeknél készültek. A 2,4 J/cm² energiasűrűséggel leválasztott rétegen a főtt tojásfehérje nem emésztődött meg, eredeti állapotában megmaradt a vékonyréteg felületén, ami azt jelenti, hogy az FTIR spektrumok hasonlósága ellenére a vékonyréteg elvesztette biológiai funkcionalitását, nem felel meg a kívánalmaknak [124].



IV.22. ábra A vékonyrétegek enzimatikus képességét tesztelő kísérleti elrendezés vázlata.

IV.1.5. Ureáz vékonyréteg készítése MAPLE és PLD technikákkal, a két módszer összehasonlítása

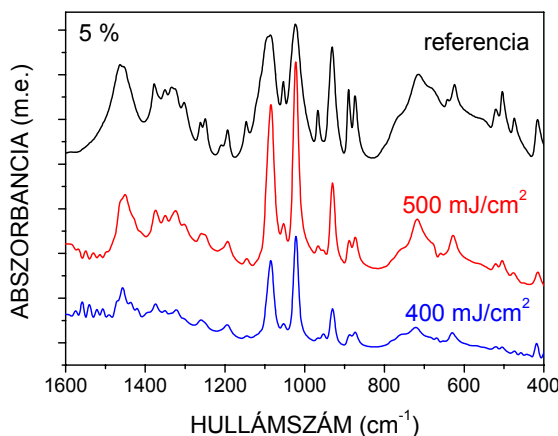
MAPLE-PLD összehasonlító kísérleteimben azért ezt az anyagot használtam, mert elég nagy molekulájú, vízben oldódik, de nem lép reakcióba azzal, a biológiai szerkezete jól ismert és az általa katalizált reakció során a vezetőképességének, kémhatásának megváltozása miatt bioszenzor alapanyaga lehet.

a) Vékonyréteg leválasztás MAPLE módszerrel

A bevezetőben látható volt, hogy az ureáz egy viszonylag bonyolult vegyület, így tartottam attól, hogy PLD eljárással nem sikerül biológiailag aktív vékonyréteget előállítani belőle. Ilyen esetekre, azaz komplex, szenzitív anyagokra az irodalom a MAPLE technikát javasolja. Ennek megfelelően az alábbi kísérletben a rétegleválasztást ezzel a módszerrel terveztem megvalósítani. Mátrixanyagként az irodalomban már bevált vizet [53-56] választottam, mert

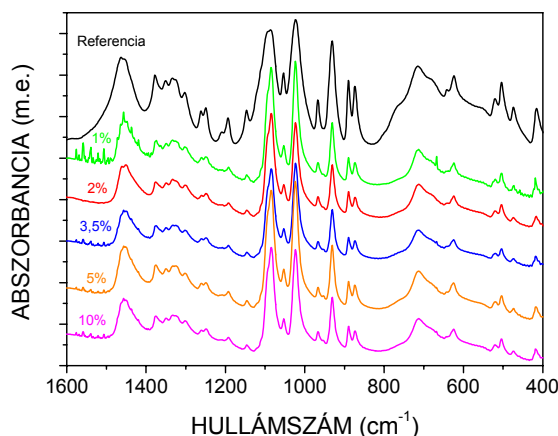
relatíve magas az olvadáspontja és az ureáz jól oldódik benne. A technikának megfelelően át kellett alakítanom a PLD kamrát, azaz olyan mintatartót kellett készítenem, mely folyadékok esetén is megfelelő, illetve alkalmas a minta megfelelő hűtésére is. Ez utóbbit Peltier-elemekkel oldottam meg, s az így elérhető legalacsonyabb hőmérséklet $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ volt, az eljárás során ennyire hűtöttem le a mintafolyadékokat. Első lépésként meg kellett határozni azt az energiasűrűség értéket, melynél sztöchiometrikus ureáz vékonyréteget sikerül leválasztani. Ehhez 5 vegyes(m/V)%-os vizes oldatot alkalmaztam, s az energiasűrűséget $100\text{--}500\text{ mJ/cm}^2$ között változtattam. Ebben az esetben is Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiát alkalmaztam a rétegek és a kiindulási anyag spektrumának összehasonlítására.

Kimutattam, hogy 100 és 200 mJ/cm^2 -nél a főbb ureáz enzimre jellemző csúcsok hiányoznak a spektrumból. Ezek többsége a 300 mJ/cm^2 értéknél már megjelenik, de kémiai azonosságot csak 400 mJ/cm^2 -től figyeltem meg (IV.23. ábra).



IV.23. ábra: Az 5%-os oldatból különböző energiasűrűségek mellett KBr tablettára leválasztott vékonyrétegek FTIR spektrumai

Elvégeztem 1; 2; 3,5; 5 és 10%-os oldatokkal is a leválasztási kísérleteket, mindegyik mintát 20000 impulzussal besugározva, 400 mJ/cm^2 -en. Eredményül a következő grafikont kaptam:

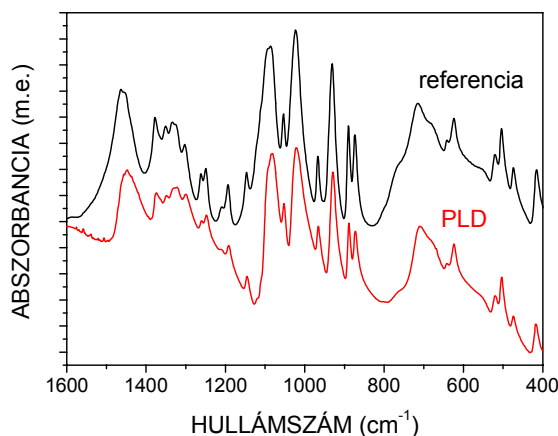


IV.24. ábra Különböző koncentrációjú oldatokból MAPLE-lal leválasztott vékonyrétegek spektrumai

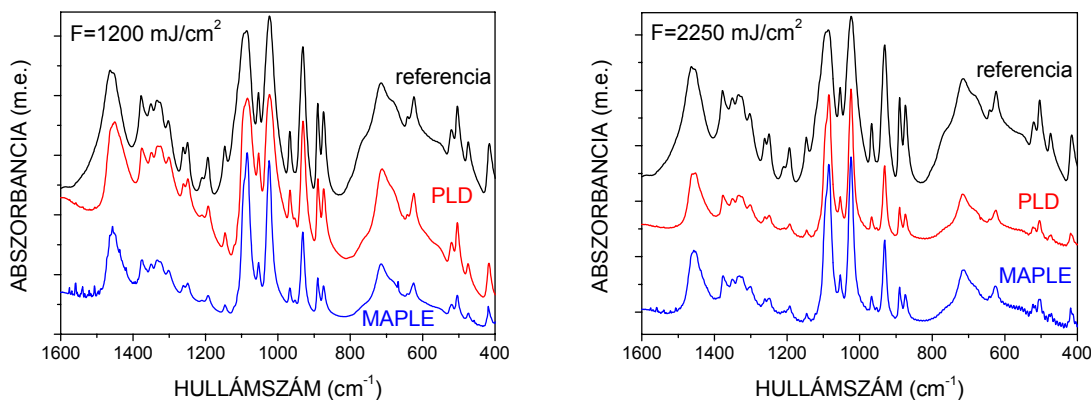
Jól látható, hogy az adott kísérleti paraméterek esetén mindegyik oldattal lehetséges volt kémiaailag azonos ureáz vékonyréteget leválasztani. Próbáltam magasabb koncentrációk esetén is vizsgálatot végezni, de oldhatósági problémák miatt 10 %-osnál töményebb oldatot nem tudtam előállítani.

b) Vékonyréteg leválasztás PLD-vel

Az előző fejezetben bebizonyosodott, hogy a MAPLE módszer alkalmas sztöchiometrikus ureáz vékonyréteg építésére. Ezek után felmerült bennem a kérdés, vajon lehetséges lenne-e megfelelő paraméterek alkalmazása esetén PLD-vel is megvalósítani a rétegleválasztást ebből az összetett molekulájú anyagból. Ezért először a MAPLE-hez hasonlóan 400 mJ/cm^2 -es energiasűrűségnél készítettem réteget KBr tablettára a spektroszkópiai vizsgálatokhoz, hogy megvizsgáljam, milyen kémiai összetételű filmet kapok, ha a lézerrel közvetlenül egy tisztán ureáz porból préselt tablettát lövök meg. Várakozásommal és az irodalom által jóslatokkal ellentétben a PLD-vel leválasztott réteg a spektroszkópiai vizsgálatok szerint kémiaailag azonos volt a referenciatabletta ureáz anyagával (IV.25. ábra).

IV.25. ábra PLD-vel készített réteg spektruma ($F=400 \text{ mJ/cm}^2$)

A következőkben arra kerestem választ, hogy az általam alkalmazott PLD elrendezésben mely energiasűrűségnél mutatnak a referenciától eltérő spektrumot a két módszerrel (MAPLE és PLD) létrehozott rétegek. Az irodalom szerint kell lennie olyan energiasűrűségnek, ahol a PLD már szétroncsolja az enzimet, de a MAPLE még használható, hiszen ez mutatná a MAPLE módszer előnyét a PLD-vel szemben a biológiai vékonyréteg leválasztás területén. Ennek megfelelően megemeltem a lézer energiáját, illetve amikor ez már nem volt tovább lehetséges, a foltméret csökkentésével próbáltam meg elérni azt az energiasűrűséget, ahol az ureáz a PLD során elbomlik. Először 1200 mJ/cm^2 -es, majd a foltméret lecsökkentése után 2250 mJ/cm^2 -es energiasűrűség értékekkel is abláltam az ureáz tablettát. Ezzel párhuzamosan MAPLE módszerrel is készítettem vékonyréteget KBr tablettára a fenti energiasűrűségekkel, hogy lássam a két módszer közötti esetleges különbséget. A spektroszkópai mérések során azonban nem találtam eltérést a rétegek és a referenciatabletta anyaga között ezeken az újabb energiasűrűségeken sem (IV.26. ábra).

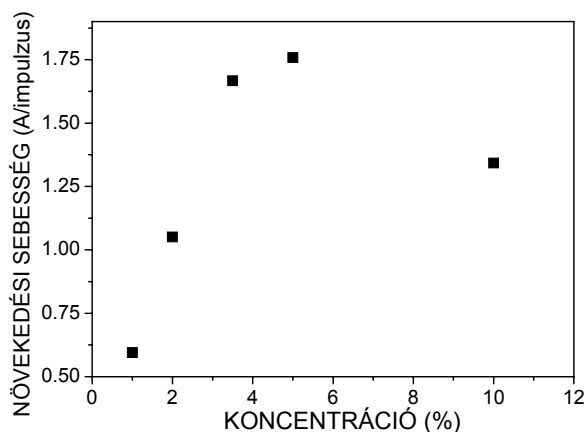


IV.26. ábra MAPLE és PLD-vel készített rétegek spektruma magasabb energiasűrűségek alkalmazása esetén

A spektroszkópai vizsgálatok alapján tehát azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PLD-vel készített rétegek is kémiaiilag azonosak voltak a referenciatabletta ureáz anyagával, valamint az általam alkalmazott energiasűrűségeknél nem volt különbség a MAPLE-lel és a PLD-vel leválasztott vékonyrétegek spektrumai között sem [125].

c) Rétegvastagság vizsgálatok

A rétegvastagság mérésekhez a leválasztást maszkon keresztül szilícium lapkákra végeztem el. A szubsztrátra egy kereszt alakú rézlemezt rögzítettem azért, hogy a mintán megfelelő viszonyítási pontokat (null-szintet) kapjunk ahhoz, hogy az épített rétegek vastagságát az aktuális helyeken pontosan meg tudjam határozni. A kísérletek során alkalmazott energiasűrűség 400 mJ/cm^2 volt és minden esetben 6000 impulzussal lőttem meg a céltárgyat. A rétegeket 1; 2; 3,5; 5 és 10%-os ureáz oldatokból készített mátrixokból választottam le (IV.27. ábra).

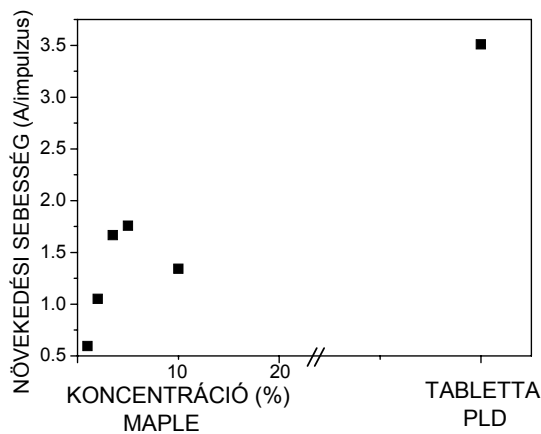


IV.27. ábra A MAPLE-lel készített vékonyrétegek leválasztási sebessége ($F=400 \text{ mJ/cm}^2$)

Az eredmények az mutatják, hogy a koncentráció emelésével a rétegépítés sebessége az 5%-os koncentrációig növekszik. A növekedés mértéke eleinte egyenletes, majd 3,5 és 5% között csökken, a 10%-os oldatból leválasztott réteg pedig már vékonyabb volt, mint az 5%-os. A leggyorsabban tehát az 5%-os oldatból lehet MAPLE-lel réteget építeni. Feltevésem szerint ennek oka az, hogy a 10%-os oldat már viszonylag tömény ehhez a technológiához. Az oldott anyag mennyisége olyan nagy, hogy a besugárzás során ekkor már bizonyos mennyiségű fehérje is elbomlik, és ezek már nem jutnak át a szubsztrátra. Ezt az is igazolja, miszerint a 10%-os oldatok esetén a meglőtt céltárgyak felszíne megbarnult a besugárzás során, illetve

égett fehérje szagú volt. A barnulást az ureáz széntartalmának kiválásával magyarázhatjuk. A rétegekkel kapcsolatban ilyen tapasztalatom nem volt, és a spektroszkópiai vizsgálatokkal sem találtam jelét annak, hogy idegen anyag észlelhető mennyiségben szennyezné a filmeket. Sajnos nagyobb koncentrációjú oldatból nem tudtam rétegeket leválasztani a maximum létének még meggyőzőbb igazolásához, mert, mint korábban már említettem, már 15 %-os oldatot sem tudtam készíteni, mivel az ureáz ilyen töménységben már nem oldódott fel maradéktalanul.

Megvizsgáltam a réteg növekedési sebességét PLD esetére is 400 mJ/cm^2 -es energiasűrűségnél, hogy összehasonlíthassam a MAPLE technikával kapott eredményekkel (IV.28. ábra).



IV.28. ábra A növekedési sebességek összehasonlítása ($F=400 \text{ mJ/cm}^2$)

Látható, hogy PLD esetén az elért rétegvastagság duplája a MAPLE-lel megvalósított legnagyobb értéknek, ami azt sugallja, hogy ebben az esetben nem biztos, hogy érdemes a MAPLE technikát alkalmazni, hiszen jóval bonyolultabb, több időt igényel egy réteg elkészítése, ráadásul kevésbé hatékony, mint a hagyományos módszer, amivel ugyanolyan összetételű rétegeket kaphatunk.

d) Eltávozó és lerakódott anyagmennyiségi vizsgálatok

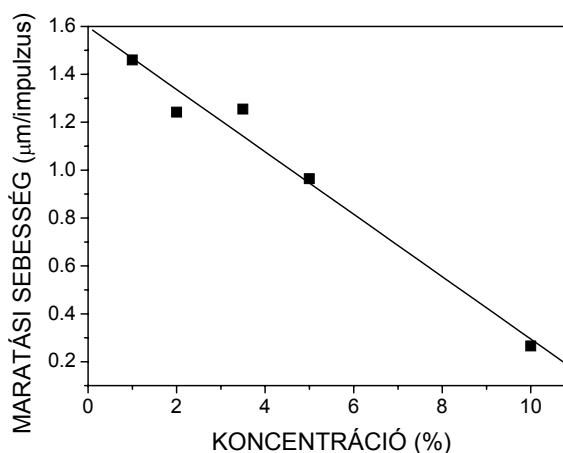
Ebben a kísérletsorozatban azt kívántam megbecsülni, hogy különböző koncentrációjú oldatoknál és tiszta ureáz tablettánál mennyi anyag távozhat el az abláció során a céltárgyból, s ennek mekkora hányada jelenik meg a szubsztráton vékonyréteg formájában. A mérést 1, 2, 3,5, 5 és 10%-os oldatokra (MAPLE), illetve ureáz tablettára (PLD) végeztem el. Az alkalmazott impulzusszám 500, az energiasűrűség 400 mJ/cm^2 volt. Ebben az esetben a

céltárgyak mindig azonos helyét lőttem, hogy jól meghatározható méretű, térfogatú maratási gödröket kapjak. MAPLE esetén miután meglőttem egy mintát, gyorsan kivettem a vákuumkamrából és egy Nikon optikai mikroszkóppal lemértem az ablált gödör mélységét. A mérést gyorsan kellett végrehajtani, mivel a minták olvadási ideje kb. 1,5 percre adódott. Az ablált folt területe MAPLE esetén $T=3,78 \text{ mm}^2$, PLD-nél pedig $T=3,65 \text{ mm}^2$ volt. A maratási gödör alakját egy dőlt hengertesttel közelítettem, melynek térfogata $V=T \cdot m$ képlettel kapható meg, ahol m a hengertest magassága. A mikroszkópos mérések alapján tehát meghatároztam a maratási gödör térfogatát, ennek egy impulzusra eső részét, s ebből a koncentráció ismeretében az általa tartalmazott ureáz mennyiségét (3. táblázat).

Koncentráció	1%	2%	3,5%	5%	10%	PLD
Maratási mélység	730 μm	621 μm	627 μm	482 μm	133 μm	139 μm
Térfogat	2,759 mm^3	2,347 mm^3	2,37 mm^3	1,821 mm^3	0,502 mm^3	0,507 mm^3
Térfogat/Impulzus	$5,51 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$	$4,69 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$	$4,74 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$	$3,64 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$	$1,005 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$	$1,014 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$
Oldott anyag tömege az elablált térfogatban	$5,51 \cdot 10^{-8} \text{ g}$	$9,38 \cdot 10^{-8} \text{ g}$	$1,65 \cdot 10^{-7} \text{ g}$	$1,82 \cdot 10^{-7} \text{ g}$	$1,005 \cdot 10^{-7} \text{ g}$	$1,262 \cdot 10^{-6} \text{ g}$

3. táblázat

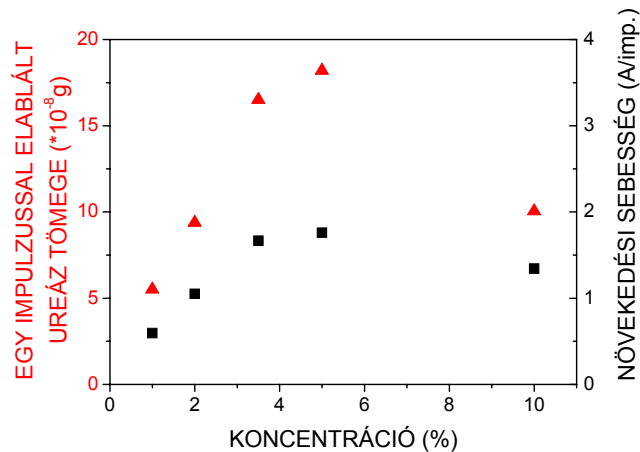
A mélység adatokból kiszámolható a maratási sebesség a koncentráció függvényében. A IV.29. ábra ezt mutatja MAPLE esetén.



IV.29. ábra A maratási sebesség az ureáz oldatok koncentrációinak függvényében (MAPLE)

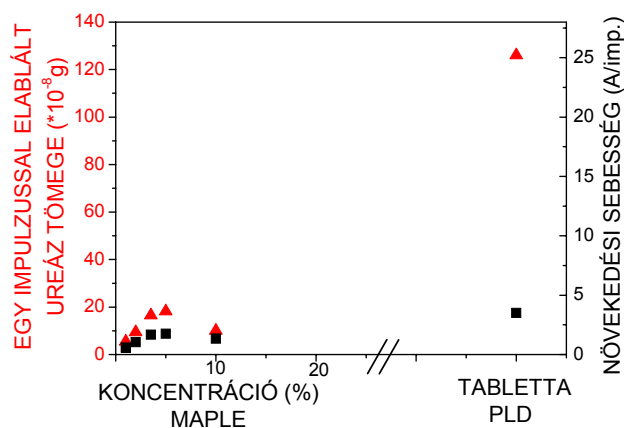
Az ábrán jól látszik, hogy minél kisebb a koncentráció, annál több anyag ablálódik el az oldatból. A nagy koncentrációjú oldatokból valószínűleg azért távozott el kevesebb anyag, mert több ureázt tartalmaztak, ezért a lézer energiája kisebb mélységben, térfogatban nyelődött el.

Ábrázolva az eltávozott ureáz tömegét és a keletkezett rétegek vastagságát megállapítható, hogy az elablált ureáz tömege és a rétegnövekedés sebessége hasonló tendenciát mutat. (IV.30. ábra).



IV.30. ábra A rétegnövekedési és ablációs sebesség összehasonlítása MAPLE esetén

Ha a PLD során besugárzott tablettából és a MAPLE-hez előkészített céltárgyakból elablált ureáz tömegét egyszerre ábrázoljuk (a MAPLE esetén természetesen a koncentráció függvényében és a PLD-t pedig emellett külön részen), akkor az alábbi grafikont (IV.31. ábra) kapjuk:



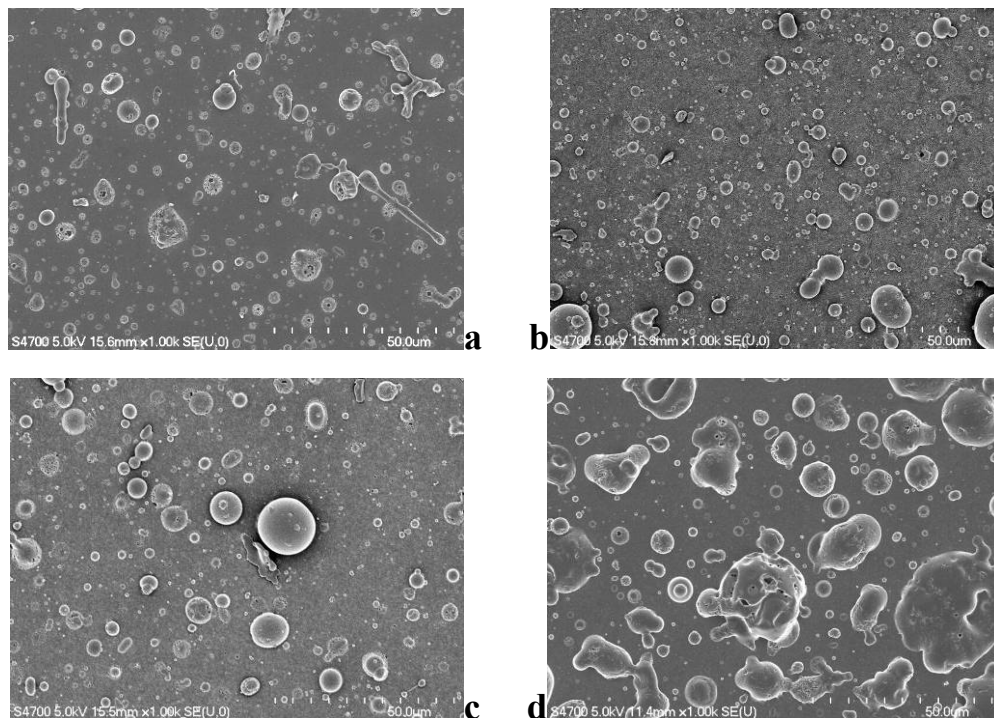
IV.31. ábra A rétegnövekedési és ablációs sebesség összehasonlítása MAPLE és PLD esetén

Látható, hogy PLD-vel gyorsabban lehet réteget növesztetni, de nem annyival lesz nagyobb a rétegnövekedés sebessége, mint amennyivel több ureáz anyag ablálódik el a MAPLE-hez

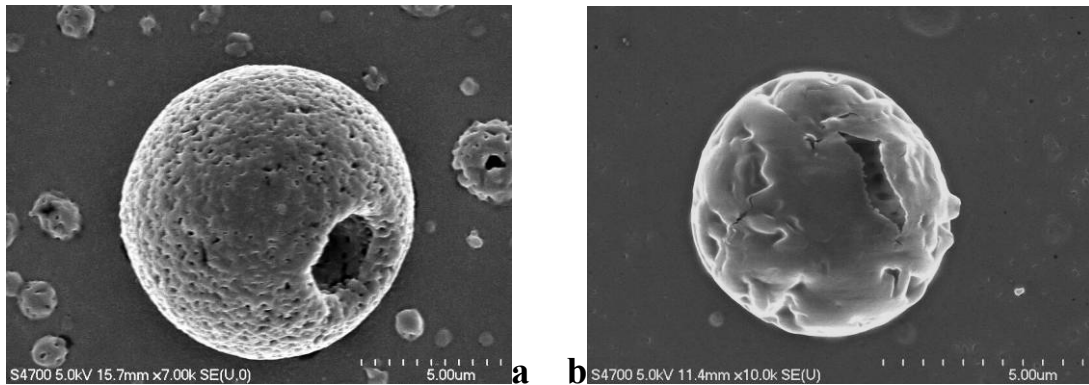
képest. Ez azzal magyarázható, hogy a tabletta esetén a lézerrel kölcsönható ureáz molekulák egy része elbomlik, nem épül be a rétegbe [125].

e) Morfológiai vizsgálatok

A leválasztott rétegek felületi szerkezetéről már a profilométeres eljárás is nyújtott némi információt. Ez persze nem lehetett teljes, hiszen így csak egy vonal mentén vizsgálható megfelelő feloldással a minta. Az AFM-es mérés nem jöhetett szóba, mert a kapott felület egyenetlenségei meghaladták az atomi erő mikroszkóp mérési tartományát. További információt a vékonyrétegek morfológiájáról pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálataim szolgáltattak. Dr. Tóth Zsolt kollégám segítségével tanulmányoztam az 1, 2, 5 és 10%-os oldatból MAPLE-lel és a PLD-vel leválasztott vékonyrétegek szerkezetét. A fényképeket több különböző mérettartományban készítettük a 180-szorostól egészen a 20000-szeres nagyításig. A felvételek tanúsága szerint a mintáink felületén több szemcse figyelhető meg, a felület egyenetlenségei meglehetősen nagyok a rétegek vastagságához képest. A PLD-s rétegek felületén kevesebb és kissé nagyobb méretű szemcse látható, mint a MAPLE rétegeken, de számottevő különbség nem tapasztalható (IV.32. ábra). Gyakran megfigyelhetők viszonylag nagyméretű, gömb alakú képződmények, melyek lyukacsos szerkezetűek (IV.33. ábra).



IV.32. ábra Az 1 (a), 5 (b) és 10%-os (c) oldatokból MAPLE-lel és PLD-vel (d) készített rétegek elektronmikroszkópos képei 1000-szeres nagyítással.



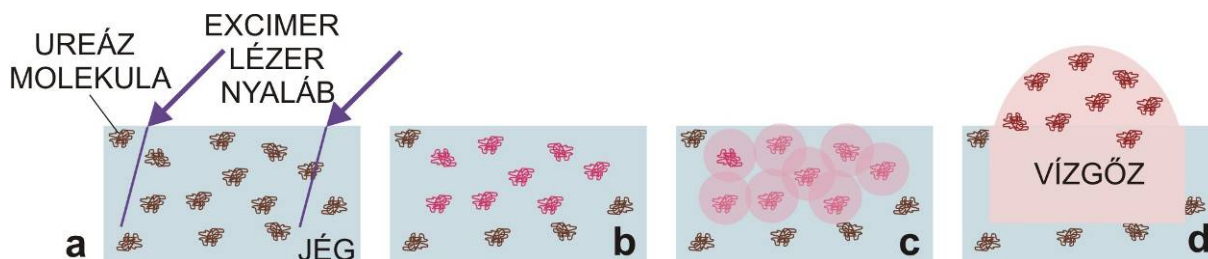
IV.33. ábra Az 1 %-os oldatból MAPLE-lel (a) és a PLD-vel (b) készített rétegeken található tipikus szemcsék elektronmikroszkópos képe 10000-szeres nagyítással.

f) Új modell a MAPLE leírására

Az irodalom szerint a MAPLE technika úgy működik, hogy a mátrixállapotban lévő oldószer nyeli el a lézersugár energiáját, felforr, felbomlik, és az abláció során ez a kilöködő mátrixanyag az, amely a rétegbe leválasztani kívánt anyagot magával sodorja, kilöki [126]. Mivel kísérleteimben vizet alkalmaztam mátrix anyagként, így a vizsgált jelenségek megértéséhez, leírásához szükségem volt a jég abszorpciójának ismeretére. A MAPLE mechanizmusának irodalombeli leírása alapján feltételeztem, hogy viszonylag nagy lehet, emiatt az ablációs sebességre vonatkozó összefüggés alapján megpróbáltam kimérni a jég abszorpciós együtthatóját az alkalmazott lézer 248 nm-es hullámhosszán, de ez nem sikerült, mivel a jég transzmissziója olyan nagynak bizonyult, hogy a tiszta vízből lefagyasztott jeget 1 J/cm²-s energiasűrűséggel sem tudtam ablálni. Ezután vettem egy 1 cm vastag jégkockát, s megállapítottam, hogy közel 50 %-os transzmisszióval rendelkezik 248 nm-en, ami azt jelenti, nem lehet abszorbensként alkalmazni. Mivel azonban a vékonyréteg leválasztási kísérleteim sikeresek voltak, ebből arra lehet következtetni, hogy a vizet mátrixanyagként felhasználó MAPLE-re az irodalomban korábban leírt leválasztási elméletek nem helytállóak, távolról sem úgy működik a módszer, mint ahogy leírták.

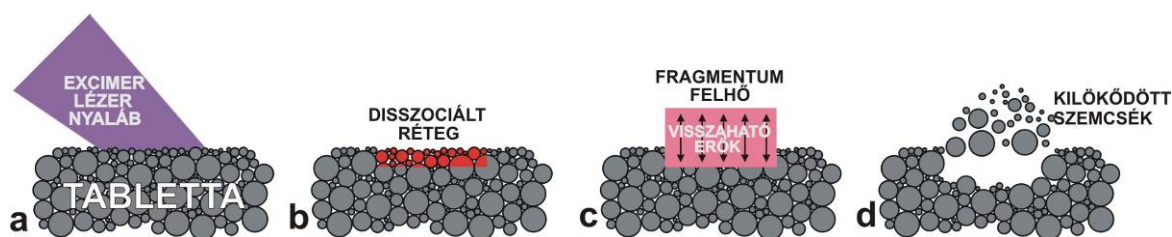
Nos, ha nem a jég, tehát nem a mátrixanyag nyeli el a lézer energiáját, akkor nyilván a vízben oldott anyag (a mi esetünkben az ureáz) teszi ezt. Ezek szerint tehát nem igaz az, hogy ennél a módszernél kiküszöbölhető a lézerfénynek a célananyaggal való kölcsönhatása. Mivel a leválasztások utáni spektroszkópiai mérések azt mutatták, hogy az ureázt mégis sikerült átvinni a vékonyrétegbe, olyan modellt kellett kidolgozni, amivel ez megmagyarázható. Úgy gondolom, hogy a lézerfény az ureáz molekulákkal való gyors kölcsönhatása során valóban

bizonyos mértékig felmelegíti azokat (IV.34.a-b ábra), azonban ez a hőmérséklet nem tudja elérni a molekula bomlási hőmérsékletét, mert a hő gyorsan átadódik a részecskét körülvevő vízmolekuláknak (IV.34.c ábra). A víznek még jég formájában is igen nagy a hőkapacitása, így elég gyorsan képes olyan mennyiségű hőenergiát elvezetni, hogy az oldott anyag ne károsodjon. A felmelegedett víztérfogat gyorsan elolvad és felforr, majd a keletkezett gőz túlnyomása miatt kirobban a mintából és magával sodorja a célanyag molekuláit is (IV.34.d ábra).



IV.34. ábra A vizes MAPLE anyag-eltávozási folyamata

A kísérleteim bebizonyították, hogy a PLD módszer is alkalmas az ureáz vékonyréteg leválasztására. Ennek magyarázatát az ablációs és a leválasztási sebességeket összehasonlító grafikon alapján adtam meg. Ebből jól látható, hogy az ablációs sebesség PLD esetén több mint hatszorosa a MAPLE maximális maratási sebességének, míg a rétegek leválasztási sebessége már csak kétszer akkora. Ez úgy értelmezhető, hogy az ureáz porból préselt tabletta anyagának egy része valójában afféle MAPLE mátrixanyagként viselkedik, azaz elnyeli az impulzusenergiát, felmelegszik, felforr, kirobban a mintából és közben elbomlik, ugyanakkor sértetlen molekulákat tartalmazó szemcséket is magával sodor, melyek aztán beépülnek a vékonyrétegbe (IV.35. ábra). Ezzel magyarázható tehát az a megfigyelés, hogy PLD esetén arányaiban jóval kevesebb anyag épül be a rétegekbe, mint amennyi a céltárgyból eltávozik.



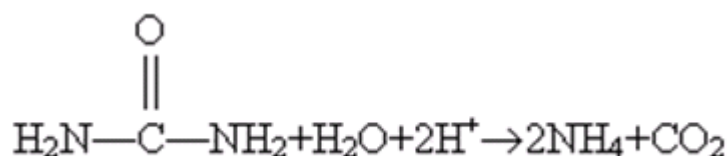
IV.35. ábra: Az anyageltávozás folyamata porból préselt tabletta ablációjakor

Tapasztalataim szerint ez a modell érvényes kell, hogy legyen a korábban tárgyalt esetekre is, azaz amikor a PLD során mikrométeres szemcseméretű porokból préselt céltárgyakból történt a rétegleválasztás. Azt ugyanis nehéz elképzelni, hogy egy olyan összetett rendszert, mint például a 19 aminosavból álló pepszin molekulát úgy viszünk át egyik helyről a másikra,

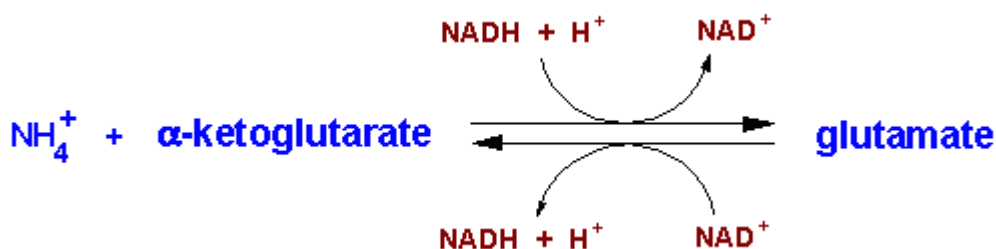
hogy az eljárás közben kémiaailag szétbontjuk, majd a hordozón újra összerakjuk, amint azt a klasszikus PLD-ről szóló modellekben leírták. Elméletem megmagyarázza a különböző mikroszkópokkal megfigyelt rétegalkotó, viszonylag nagy méretű, mikrométeres szemcsék létét, illetve leírja azokat a folyamatokat, amelyek hatására a tárgyalt sérülékeny biológiai/biokompatibilis anyagok károsodás nélkül átmásolódnak a hordozóra, réteget alkotva rajta.

g) A vékonyrétegek biológiai aktivitási vizsgálata

A spektroszkópai vizsgálataim bebizonyították, hogy az elkészített vékonyrétegek kémiai összetétele azonos volt a referenciatabletta ureáz anyagával. Azonban ez még nem garancia arra nézve, hogy a rétegek megőrizték biológiai funkcionalitásukat is. Erre vonatkozóan még egyéb, biológiai vizsgálatokat is le kellett folytatni. Az ez irányú méréseket egy Román-Magyar TÉT együttműködésben a Bukaresti Egyetemen végezték el számomra az alábbiaknak megfelelően. A IV.36. ábrán látható ureáz által katalizált folyamatban ammónia keletkezik, melynek direkt kimutatása még nehézkes, ezért egy második reakció segítségével (amelynek ammónia az egyik alapanyaga) optikai úton mutatják ki az ammónia jelenlétét és így a megelőző reakció bekövetkeztét is (IV.37. ábra).



IV.36. ábra Az ureáz által katalizált reakció



IV.37. ábra: Az ammónia jelenlétében lejátszódó második reakció

Az α -ketogluterát-hidrogenáz enzim működése során ammónia jelenlétében a IV.37. ábrán látható reakciót katalizálja, melynek során a NADH-ból és egy protonból NAD^+ keletkezik. Ezen a ponton már lehetséges a folyamat optikai vizsgálata, mivel a 340 nanométeres

hullámhosszon a NADH-nak van abszorpciója, a NAD^+ -nak viszont nincsen. Tehát, ha a mérések során azt tapasztaljuk, hogy az abszorpció csökken, ebből arra következtethetünk, hogy a IV.37. ábrán bemutatott folyamat működik. Ez pedig akkor lehetséges, ha a IV.36. ábrán látható, az ureáz enzim által katalizált, tehát aktív ureáz enzim jelenlétében végbemenő reakció működik. Ily módon ez a módszer alkalmas volt arra, hogy az elkészített vékonyrétegek aktivitását megvizsgálják. Az eddigi eredmények alapján elmondható, hogy a 10%-os ureáz oldatból és a PLD-vel 400 mJ/cm^2 -n leválasztott ureáz rétegek biológiailag aktívak maradtak [127]. Ez azt jelenti, hogy az ureáz impulzuslézeres leválasztása a későbbiekben alkalmas lehet arra, hogy bioszenzorokhoz vékonyréteget készíthessünk vele [128].

IV.1.6. „Fog-vékonyréteg” előállítása impulzuslézeres vékonyréteg építéssel

a) Az implantátumok és a hidroxilapatit

A fogászati implantátumok története a régmúltba nyúlik vissza. Már az ókorban is kísérleteztek fogbeültetéssel, melyhez emberi csontot, állati csontot, majd később fémeket használtak. Ezek ún. endossealis beültetések voltak, azaz a csontba készített üregbe, furatokba helyezték bele az implantátumokat, melyek azonban hamar kilöködtek. Napjainkban a szájsebészetben és ortopédiában sokféle implantátumot alkalmaznak, melyek szervezetbe való beépülésének alapkövetelménye a biokompatibilitás. A csontokba ültetett, terhelésnek kitett implantátumok esetében a rájuk ható nyomás tartós elviselése szempontjából fontos az oszeointegráció, melynek során az implantátumok felszínén lévő mikropórusokba közvetlenül belenőnek a kötőszöveti sejtek. A tapasztalatok azt mutatták azonban, hogy a fogimplantátumok az esetek bizonyos százalékában kilöködnek a szervezetből, vagyis a csontintegráció nem jön létre. Ennek oka az, hogy a beültetett implantátumok szájüregbe nyúló része miatt nemkívánt összeköttetés jött létre a szervezet steril világa és a külvilág között, ugyanis a mucronk és a feszes ín között csak kötőszövetes zárás van, szemben a fogak és az ín közötti hámtapadással. Ez a csontot és az implantátumot körülvevő szövetek állandó fertőzésének forrása lehet, amely heveny gyulladásokhoz, végül a környező szövetek és a csont pusztulásához, az implantátum kilöködéséhez vezethet [129]. Az oszeointegrációt a felület morfológiája és kémiai szerkezete egyaránt befolyásolja. Az implantátum felületének érdesítésével – például lézeres ablációval [130] – az érintkezési felület és ezáltal a csontsejtek

tapadási képessége megnő, ami rövidebb gyógyulási időtartamhoz vezethet [131-133]. A titán – a leggyakrabban alkalmazott implantátum anyag – biokompatibilitását a felületén levő TiO_2 rétegnek köszönheti [134], továbbá kimutatták, hogy más kerámiák is, mint például az Al_2O_3 [135] és SiC [136] szintén vér kompatibilisek. Ion implantációval kezelt felületű titánt nyulak csontjába ültetve kimutatták, hogy a CO javította a beépülést [137].

Csont helyettesítésére egyik alkalmasnak ígérkező anyag a hidroxilapatit (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, melynek kémiai összetétele és kristallográfiai tulajdonságai hasonlóak a csont anyagához. Azonban törékenysége következtében a HA csak kompozitként [138], vagy titán implantátumok bevonataként alkalmazható. HA bevonatokat már többféle módszerrel állítottak elő, például impulzuslézeres vékonyréteg építéssel [139], elektroforetikus- [140] és elektronnyalábos leválasztással [141], ion implantációval [142].

A biológiai apatitok összetétele különbözik a szintetikus, sztöchiometrikus HA-tól a különböző ion, főként a karbonát ion tartalom miatt, ezért ezeket karbonáttartalmú hidroxilapatitoknak is nevezik (*carbonated hydroxylapatite, CHA*) [143]. Ilyen vékonyrétegeket sikeresen állítottak elő PLD-vel szintetikus HA céltárgy alkalmazásával [144].

b) „Fog-vékonyréteg” leválasztása

Felmerült az az elképzelés, hogy biológiai szempontból a legtermészetesebb/legalkalmasabb bevonat maga a fog anyaga lenne. Elkerülve az esetleg fellépő, idegen testből származó immunreakciókat, az implantátum felületének saját fogszövet anyagával történő bevonása járható útnak látszik. Ezért az alábbiakban azt tűztam ki célul, hogy demonstráljam, PLD-vel lehetséges szervezetbarát bevonatot, „fog-vékonyréteg”-et előállítani különböző, pl. titán hordozókra humán fogat használva kiinduló anyagként.

A célkitűzésnek megfelelően először röviden tekintsük át a fog részeit. A fog külső rétegei különböző mértékben elmeszesedett szövetekből épülnek fel. Legkeményebb a fogkoronát borító zománc, amely kristályos szerkezetű. Hasonló a foggyökér körülvevő csontszövetből álló cement rétege is. A két külső réteg alatt a fog kemény állományának a legnagyobb részét kitevő dentin található. A dentin veszi körül a fogüreg, melyet a lazarusos kötőszövet tölt ki, amit fogbélnek nevezünk. A fogbél a fog tápláló és érző szerve. Ebben találhatók a foggyökér csúcsán belépő hajszálerek és idegrostok. A fogzománc az ember és a gerincesek testének legkeményebb szövege. 96,5%-ban szervetlen sókból, 3,5%-ban szerves anyagokból és vízből áll, vegyi összetétele: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Legvastagabb a fogkorona

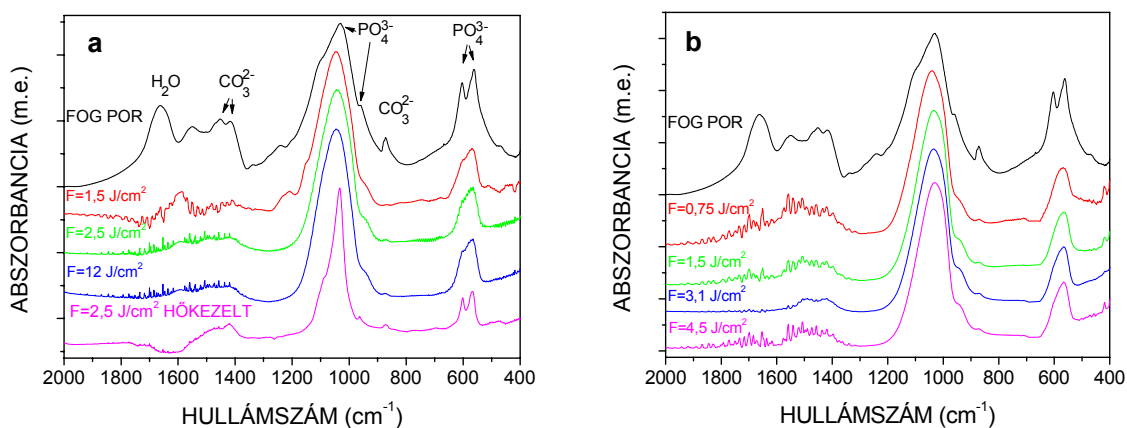
csücskén (2-2,5 mm), a fognyakon fokozatosan vékonyodik, és végül késél vékonyságúvá válik. 3-6 μm vastag prizmákból áll, ezeket kevés ragasztóanyag tartja össze. A teljesen kifejtett fogzománc élettelen szövet, gyakorlatilag anyagcseréje nincs, és ha megsérül, új zománc nem képződik. A dentin a fogak szilárd váza, melyet a fogkoronán a zománc, a foggyökéren a cement takar. A dentin a zománcnál kevésbé kemény, rugalmas, élő szövet, mely 72%-ban szervetlen sókból, 28%-ban szerves anyagokból és vízből áll. Mikroszkopikus csatornák rendszere szövi át, amelyben a fogbélből kiinduló, a zománc felé haladó rostok futnak, és érzőidegszálak is találhatók benne. A cement a fog gyökérfelszínét borítja. Szerkezete nagyon hasonló a csont felépítéséhez. A szerves alapanyagba ágyazódik a kb. 40%-nyi szervetlen anyag [129].

Fog-vékonyrétegeket most is a korábbiakban leírt PLD rendszerrel készítettem. Céltárgynak foggyökerek achát mozsárban való megőrlésével készített „fogporból” (átlagos szemcseméret: 3 μm) préselt pasztillákat használtam. A pasztillákat 150 és 450 MPa közötti nyomásokon préseltem 1 percig. Ablációjukhoz ArF ($\lambda=193\text{ nm}$, impulzushossz 20 ns) és KrF ($\lambda=248\text{ nm}$, impulzushossz 23 ns) excimer lézereket alkalmaztam. A lézernyalábot a céltárgyon megközelítőleg 1,5 mm^2 méretű területre fókuszáltam, az energiasűrűséget ArF lézer esetén 0,75 és 4,5 J/cm^2 között, KrF lézer esetén 0,75 és 12 J/cm^2 között változtattam, a lézer impulzusok száma 2000-20000 között változott. A céltárgy-szubsztrát távolság 3 cm, a vákuumkamrában a nyomás $3 \times 10^{-3}\text{ Pa}$ volt. Az FTIR spektroszkópiai vizsgálatokhoz szükséges minták esetén KBr szubsztrátot, a morfológiai vizsgálatokhoz üveget és titánt alkalmaztam, melyeknek hőmérsékletét a réteg növesztés ideje alatt 250 °C-on tartottam. A vékonyrétegek egy részét 2 órán keresztül 550 °C-on hőkezelttem. A rétegek vastagságának könnyebb meghatározásához a szubsztrátok maszkolva voltak. A leválasztott „fog-vékonyrétegek” kémiai összetételét IR spektrométerrel vizsgáltam a 4000-400 cm^{-1} tartományon, a morfológiai vizsgálatokhoz atomi-erő mikroszkópot alkalmaztam. A vékonyrétegek szubsztráthoz való tapadását ragasztószalagos teszttel és karcollással ellenőriztem.

c) A vékonyrétegek sztöchiometriai vizsgálata

Az alkalmazási lehetőségek szempontjából lényeges az épülő vékonyrétegek sztöchiometriája, ezért kísérleteim első sorozatában a rétegek összetételét vizsgáltam az alkalmazott lézer hullámhossza és energiasűrűsége függvényében.

A IV.38. ábrán láthatók az ArF (a) és KrF (b) lézerekkel, különböző energiasűrűségek mellett készített vékonyrétegek IR spektrumai, valamint a fogpor spektruma. Ez utóbbiban erős abszorpciós csúcsok láthatók 1031 , 958 , 561 és 602 cm^{-1} , valamint 1451 , 1420 és 873 cm^{-1} hullámszámnál, melyek a PO_4^{3-} és CO_3^{2-} ionokhoz rendelhetőek [144]. A vékonyrétegek spektrumában a nagymértékben lecsökkent vagy teljesen hiányzó abszorpciós vonalak 1420 és 873 cm^{-1} -nél karbonát-ion hiányt mutatnak. KrF lézer alkalmazása esetén $1,5$ és $0,75\text{ J/cm}^2$ energiasűrűségek esetén a 873 cm^{-1} -es csúcs (CO_3^{2-}) teljesen hiányzott, nagyobb energiasűrűségeknél viszont már megfigyelhető volt. 193 nm -es lézert alkalmazva már $1,5\text{ J/cm}^2$ -nél is megfigyelhető volt ez az abszorpciós csúcs. A fogpor spektrumában 3575 cm^{-1} -nél az OH^- gyöknek megfelelő abszorpciós csúcs volt megfigyelhető, míg ugyanez a vonal a vékonyrétegek esetében gyenge volt, az energiasűrűség növelésével csökkent. Az 1650 cm^{-1} -nél látható csúcs az eredeti fog anyagának víztartalmára utal, míg a vékonyrétegekben ez nem volt kimutatható. Normál atmoszférán 2 órán keresztül történő 550°C -os hőkezelés hatására a vékonyrétegek IR spektrumain a karbonát csúcsok kihangsúlyozottabbakká váltak, valószínűleg a levegő széndioxidjával való kölcsönhatás következtében. A spektrumok legfontosabb mondanivalója, miszerint a vékonyréteg növesztés során az OH^- , víz és karbonáttartalom lecsökken, azt mutatja, hogy lézersugárzás okozta hőmérsékletnövekedés hatására H_2O és CO_2 szabadul fel a fog anyagából. A kémiai összetétel megőrzéséhez a vízgőzben történő PLD egy járható út lehet, akárcsak a szintetikus CHA esetén [143].

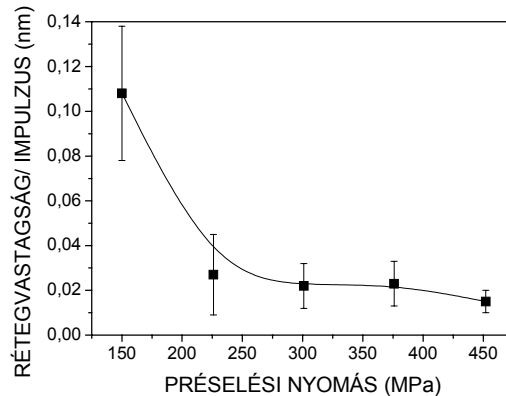


IV.38. ábra ArF (a) és KrF (b) lézerekkel, különböző energiasűrűségekkel készített vékonyrétegek IR spektrumai, valamint a fog por spektruma. Az (a) grafikon alsó spektruma egy 550°C -on utókezelt réteghez tartozik.

d) Morfológiai vizsgálatok

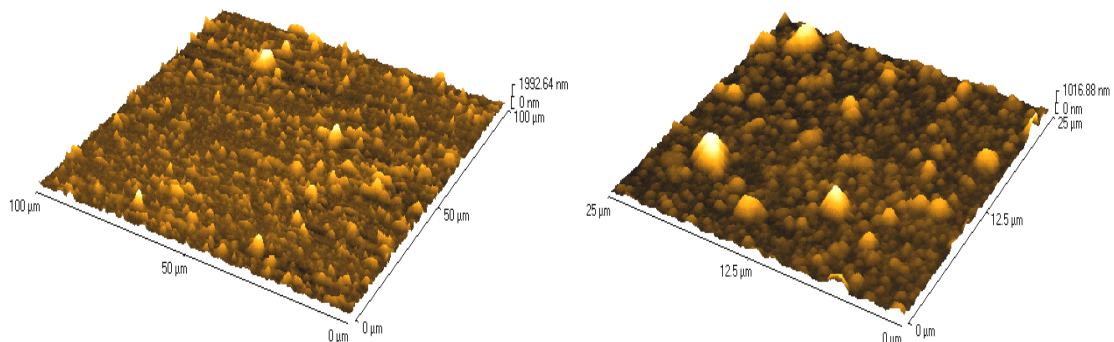
A morfológiai vizsgálatokhoz a vékonyrétegeket ArF lézerrel készítettem $1,5\text{ J/cm}^2$

energiasűrűségénél. A rétegek vastagságát az ellipszis alakú vastagságeloszlás hossz tengelyén a középponttól 8 mm-re mértem. Amint az IV.39. ábrán látható, a céltárgyak préselésekor alkalmazott nyomást 150 MPa-ról 450 MPa-ra emelve, a vékonyréteg növekedési sebessége (rétegvastagság/impulzusszám) mintegy hatod részére csökkent. Ennek két oka lehet: egyrészt a nagyobb préselési nyomás következtében a por szemcsék jobban tapadnak egymáshoz és nehezebben szakadnak ki a céltárgyból; másrészt pedig a jobban összetapadó részecskék jobb hővezető képessége a besugárzás alatt kisebb hőterhelést eredményez.



IV.39. ábra A „fog-vékonyréteg” növekedési sebessége a céltárgy préselésekor alkalmazott nyomás függvényében.

Amint a IV.40. ábrán látható, a vékonyrétegek felülete érdes, a felületi struktúrák oldalirányú mérete kisebb, mint $3\ \mu\text{m}$, azaz a céltárgyat alkotó szemcsék átlagos mérete. Ez azt mutatja, hogy az ablációs anyagfelhő nagyszámú, a céltárgyból származó és a lézersugárzás hatására tovább aprózódott szemcsét tartalmaz, ezek rakódnak le a szubsztrátra.

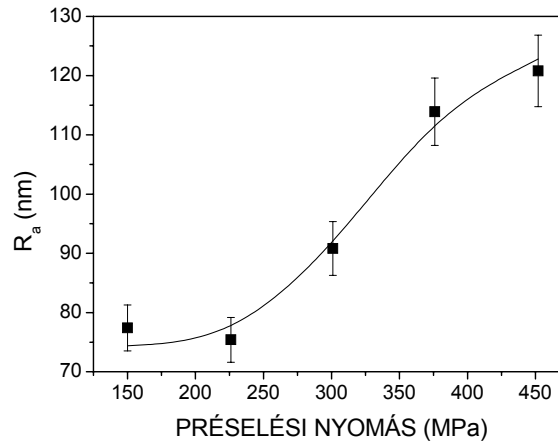


IV.40. ábra „Fog vékonyréteg” atomi-erő mikroszkópos képe. A pasztilla préselési nyomása 380 MPa, az energiasűrűség $1,5\ \text{J}/\text{cm}^2$, az impulzusszám pedig 13000 volt.

A felület érdekességének jellemzésére az R_a úgynevezett érdességi paramétert használtam, amely a leképezett felület átlagos és helyi vertikális eltéréseire jellemző érték:

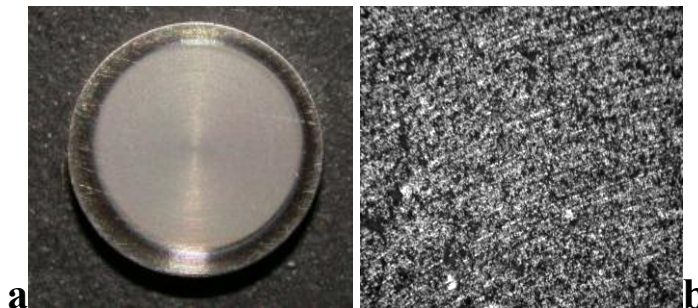
$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |f(x)| dx,$$

ahol L az ún. érdességi görbe hossza és $f(x)$ az érdességi görbe és a felület középvonalának viszonyát jelző függvény [145]. A IV.41. ábra mutatja, hogy a megközelítőleg azonos átlagos vastagágú rétegek érdessége növekszik a pasztillák préselési nyomásának emelésével. Ezt összevetve a növekedési sebességre kapott eredményekkel, azt kapjuk, hogy nagyobb préselési nyomás esetén nagyobb klaszterek, de kisebb számban szakadnak ki a céltárgyból.



IV.41. ábra 300 nm vastag „fog vékonyréteg” érdességi paraméterének függése a céltárgy préselésekor alkalmazott nyomástól.

Az üveg és titán szubsztrátra növesztett vékonyrétegeket alkotó szemcsék tapadását ragasztószalagos teszttel (Scotch-tape teszt) vizsgáltam, melynek során a vékonyrétegre ragasztószalagot simítottam, majd eltávolítottam. Ennek során a felületről leváltak a gyengén kötött szemcsék, újabb ragasztás során a leváló anyagmennyiség már elhanyagolható volt. Ez azt mutatja, hogy a szubsztrát-vékonyréteg határfelülethez közeledve a réteg tömörebbé és ellenállóbbá válik. A hőkezelés hatására a mechanikai hatásokkal szemben ellenállóbbá váltak: a ragasztószalag már első próbálkozásra sem távolított el számottevő anyagmennyiséget és a réteg nehezen karcolhatóvá vált [146].



IV.42. ábra 10 mm átmérőjű titán korongra növesztett vékonyréteg fényképe(a) és optikai mikroszkópos képe (b). A mikroszkópos képen látható gyűrűs szerkezet a korong gyártásakor keletkezett.

IV.1.7. Biológiai vékonyrétegek femtoszekundumos PLD-je

Az előzőekben bemutatott vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a nanoszekundumos excimer lézerek adott kísérleti paraméterek esetén alkalmasak sztöchiometrikus vékonyréteg leválasztásra biológiai/biokompatibilis céltárgyakból. Azonban, amint azt a kísérletek eredményei is mutatták, a lézersugárzás erősen roncsoló termális hatása miatt a hosszúláncú, összetett, szerves molekulákat tartalmazó céltárgyakból azonos összetételű vékonyrétegeket csak igen szűk energiasűrűség tartományban, általában viszonylag alacsony (gyakran 1 J/cm^2 alatti, a “szervetlen PLD”-ben általában alkalmazott néhány 10 J/cm^2 helyett) értékek alkalmazásával lehet előállítani. Feltevésem szerint egy lehetséges megoldása ennek a problémának femtoszekundumos lézerek alkalmazása a PLD eljárás során. Az ultrarövid impulzusok alkalmazásával a káros hő terjedése jelentősen leredukálható, s így nagyobb energiasűrűségek alkalmazása esetén is megóvhatjuk az érzékeny biológiai mintánkat. A korábbi kísérletek azt is kimutatták, hogy a femtoszekundumos abláció során kibocsátott anyagfelhő átlagosan 200 nm átmérőjű részecskékből áll, míg a nanoszekundumos lézerekkel leválasztott rétegeket alkotó szemcsék mérete az 5 nm -től az $5 \text{ }\mu\text{m}$ -ig is terjedhet [147,148]. Ezek mellett vizsgálataim során én úgy találtam, hogy akár több tíz mikrométeres részecskék is megjelenhetnek a filmekben. Ez azt vetíti előre, hogy a femtoszekundumos PLD-vel készített rétegek jóval homogénabbak, tömörebbek lehetnek, mint nanoszekundumos esetben.

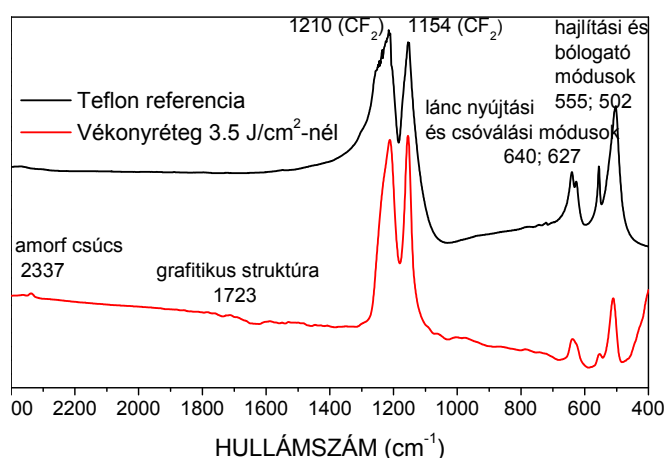
Az alábbi kísérleteim célja az volt, hogy a nanoszekundumos PLD esetén már bevált, s a fentiekben már bemutatott anyagok femtoszekundumos leválasztását is megvalósítsam, összehasonlítsam hatékonyságukat, ebben az esetben is meghatározzam az optimális leválasztási paramétereket és jellemezzem az elkészített rétegeket, kidolgozzak egy modellt az anyagátviteli folyamatok elírására.

a) Spektroszkópiai mérések

A nanoszekundumos PLD-hez hasonlóan céltárgyként most is egyszerű szerkezetű polimer (politetrafluoroetilén: PTFE), biopolimer (polihidroxibutirát: PHB, poliglikolsav: PGA), enzim (pepszin) és humán minta (fogpor) porokból préselt tablettákat alkalmaztam. Egy 450 fs impulzushosszúságú KrF excimer lézerrel végeztem a minták ablálását. A nyalábot egy 30 cm -es fókusz távolságú kvarc lencsével fókuszáltam bele a PLD kamrában, melyben a nyomás

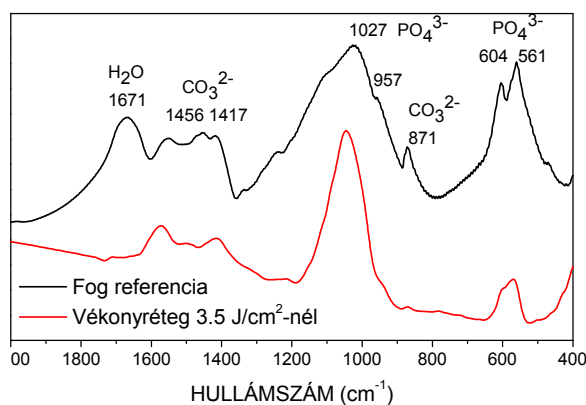
1.4×10^{-3} Pa volt. Az energiasűrűséget a $0,6\text{--}3,5$ J/cm² tartományon változtattam, az ismétlési frekvencia 10 Hz, a céltárgy – szubsztrát távolság 4 cm volt. A fog és a Teflon minták esetén a hordozót 250 °C-ra fűtöttem fel. A leválasztást a spektroszkópiai mérésekhez most is KBr tablettákra, a többi esetben szilícium lapkákra végeztem.

Az alábbi ábrásor mutatja az egyes vékonyrétegek esetében rögzített FTIR spektrumokat. Az IV.43. grafikonon a Teflon és a belőle leválasztott vékonyrétegek spektrumait lehet összehasonlítani. Látható, hogy kémiai összetételük megegyező, a megfigyelhető új kis csúcsok a leválasztott filmek amorf szerkezetére és némi grafitikus struktúrára utalnak. Jelentős energiasűrűség függést nem tapasztaltam a vizsgált tartományon.



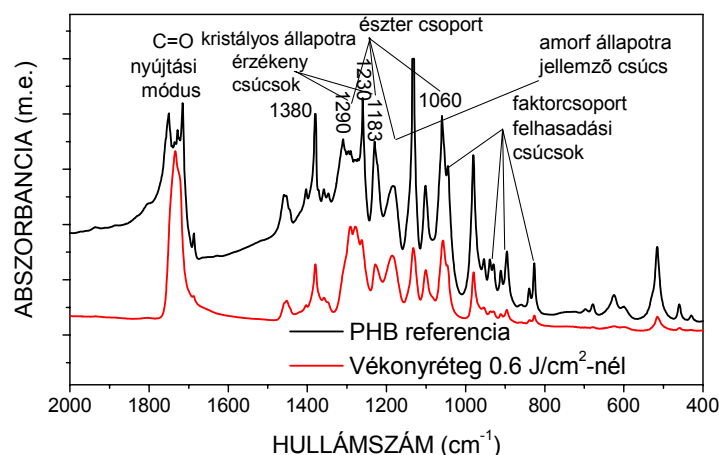
IV.43. ábra A referencia Teflon és a leválasztott vékonyréteg FTIR spektruma

“Fog-vékonyréteg” leválasztása során a legjobb illeszkedést $3,5$ J/cm² energiasűrűségnél találtam (IV.44. ábra). A víz és a karbonát csúcsok intenzitása jelentősen lecsökkent, azonban ezeket normál atmoszférán, vízgőz jelenlétében való termális utókezeléssel pótolni lehet.



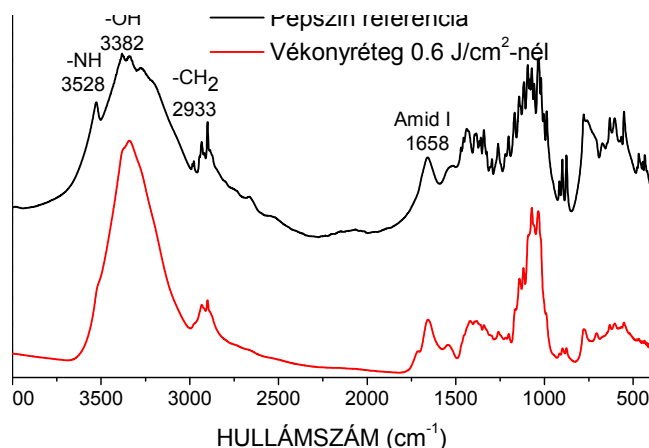
IV.44. ábra Fogpor és a „fog-vékonyréteg” spektruma

PHB esetében a $0,6 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűség érték volt a legoptimálisabb, az ennél készített réteg spektruma illeszkedett legjobban a kiindulási anyagáéhoz (IV.45. ábra). A mégis megfigyelhető eltérés abból adódik, hogy a film szerkezete sokkal amorfabb tulajdonságokat mutat, mint a kiindulási anyag. Ez az 1380 cm^{-1} -es amorf és az $1230, 1290 \text{ cm}^{-1}$ -es kristályos állapotokra jellemző csúcsok arányának megváltozásából következik.



IV.45 ábra Polihidroxibutirát por és vékonyréteg spektruma

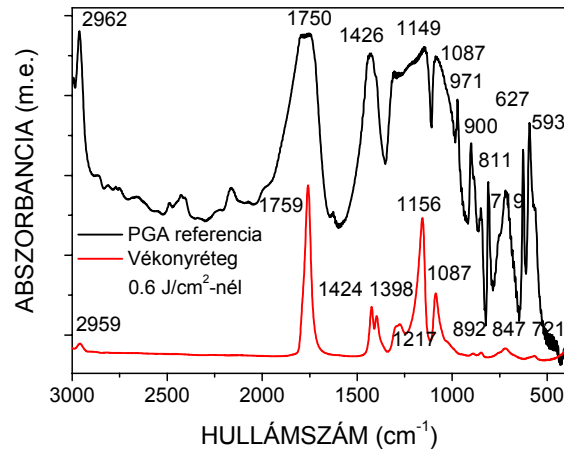
A IV.46. ábrán a pepszin és a belőle készített vékonyréteg spektruma látható. Ebben az esetben is a $0,6 \text{ J/cm}^2$ volt az optimális energiasűrűség. A jellemző csúcsok megléte itt is a sztöchiometrikus leválasztást igazolja.



IV.46. ábra Pepszin referencia és a leválasztott réteg spektruma

Az előző, igen jó egyezést mutató spektrum párokkal ellentétben a PGA esetében azt tapasztaltam, hogy a filmek spektruma nagyban eltér a céltárgyéhoz képest (IV.46. ábra). Azonban ezen különbségek oka nem kémiai szerkezetbeli eltérés, hanem itt is strukturális változásokra vezethető vissza. Ugyanis, mint Kister és munkatársainak vizsgálataiból kiderült, a

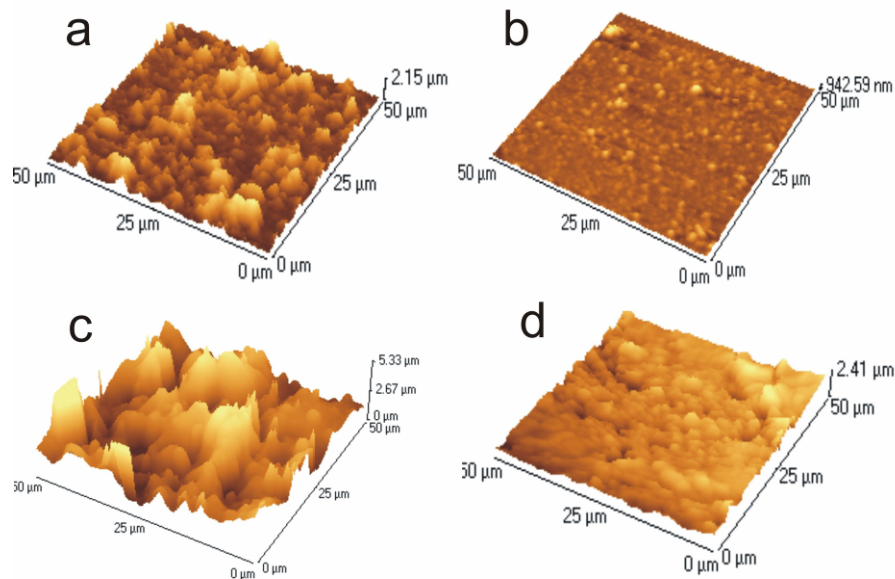
referencia spektrumunk megfelel egy szemi-kristályos PGA rétegnek, míg a leválasztott filmek spektruma megegyezik egy amorf PGA rétegével [149]. Ez tehát azt bizonyítja, hogy a femtoszekundumos PLD során optimális energiasűrűség alkalmazása esetén kémiai változás nem, kristályszerkezeti viszont bekövetkezett, szemikristályos céltárgyból amorf vékonyréteget választottam le [150].



I.47. ábra Poliglikolsav és a belőle készített biopolimer film FTIR spektruma

b) Morfológiai vizsgálatok

A Si lapokra leválasztott vékonyrétegeket atomi erő mikroszkóppal megvizsgáltam, s azt tapasztaltam, hogy a nanoszekundumos PLD során készített filmekéhez hasonló a szemcsézettségük, érdességük, felépítésük (IV.48. ábra).



IV.48. ábra: Teflon (a), fog (b), PHB (c) és PGA (d) vékonyrétegekről készített atomi erő mikroszkópos képek. A pepszin felszínét nem sikerült leképezni az AFM tű gyakori felakadása miatt.

Az ábráról jól látható, hogy az elvártaktól eltérően a rétegek femtoszekundumos esetben is nagyrészt több, akár több tíz mikrométeres méretű szemcsékből, konglomerátumokból tevődnek össze, ami azt jelzi, hogy az általam alkalmazott céltárgy anyagok leválasztása femtoszekundumos esetben sem a tradicionális PLD-ben megszokott módon történik. Ez a durva struktúra természetesen a leválasztott rétegek minőségét, homogenitását is erősen befolyásolja, jelentősen lerontja. Úgy vélem, ezekre az eredményekre is igaz a IV.1.4.f fejezetben felállított modell annyi módosítással, hogy femtoszekundumos esetben nem termális, hanem fotokémiai hatásra történik a „mátrix anyagrész” felbomlása, s a felbomlásból eredő gázok gyors kiterjedése szakítja ki, s röpíti a szubsztrát felé a kevésbé kötött szemcséket [150].

Összességében megállapítottam, vizsgálataim azt mutatták, hogy a femtoszekundumos PLD nem felelt meg az elvárásaimnak, a rétegleválasztás hatékonysága nem nőtt, az elkészített filmek nem lettek simábbak, homogénebbek, jobb minőségűek. Mindez a fentebb leírt rétegépítési modellel magyarázható.

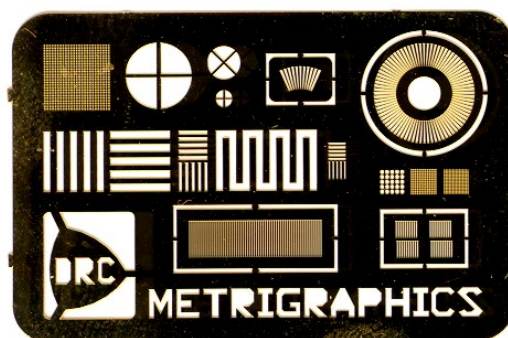
IV.1.8. Irányított sejtnövekedés, sejtstruktúrák megvalósítása PLD-vel

A korábbi vizsgálataim igazolták, hogy megfelelő kísérleti körülmények esetén mind a nanoszekundumos, mind pedig a femtoszekundumos PLD alkalmas biológiai, biokompatibilis vékonyrétegek leválasztására. Ezt, s a módszer azon tulajdonságát, miszerint megfelelő maszkkal a kívánt struktúrájú filmeket lehet előállítani használtam ki az alábbi kísérleteimben. Ezek motivációja az volt, hogy demonstráljam, sejtmegetapadást elősegítő rétegek struktúrált leválasztása lehetővé teheti különböző sejtek irányított megetapadását, növekedését, szaporodását. Mindezt azzal a távlati céllal tettem, hogy egy olyan eljárásort dolgozzak ki, melynek alkalmazásával a későbbiekben adott funkciójú sejtekből adott struktúrákat alakítsak ki, mely a szövetépítés, regenerálódás területén lehet fontos alkalmazási lehetőség.

A kísérletek során Na-alginátot, fibronektint, kollagént és endoteliális sejtmegetapadást elősegítő adalékot kevertem el keményítővel, külön-külön, s az így kapott porkeverékekből préseltem tablettákat. Mindezen anyagok közismert sejtmegetapadást fokozó anyagok <1%

koncentrációjú keverékben. A keverési arányok a következők voltak: a Na-alginát, az endoteliális sejtmegtapadást elősegítő adalék és a kollagén esetén: 0,025 t%, fibronectinre pedig: 0,0125 t%. A préselési nyomás 440 MPa volt. A tablettákat femtoszekundumos KrF excimer lézerrel abláltam, az energiasűrűséget 3.46, 2.75, 2.19, 1.55, 0.9 J/cm² energiasűrűség értékekre állítottam be. A PLD kamrában a nyomás 1.3×10^{-3} Pa volt. Első lépésként most is FTIR spektroszkópiát alkalmaztam az optimális energiasűrűség megállapításához, melyhez a rétegeket KBr tablettákra választottam le. Azt tapasztaltam, hogy 2,19 J/cm² energiasűrűség esetén sikerült sztöchiometrikus keményítő réteget kapnom. Mivel a tulajdonképpeni célanyagok koncentrációja kisebb volt, mint 1 %, így őket nem tudtam elkülöníteni a keményítőtől. Ez azt jelentette, hogy ekkor még nem tudhattam, őket is sikerült-e sérülésmentesen leválasztani a keményítő molekulákkal együtt. Feltételeztem, hogy igen, s ezt a sejtmegtapadási kísérleteim a későbbiekben igazolták is.

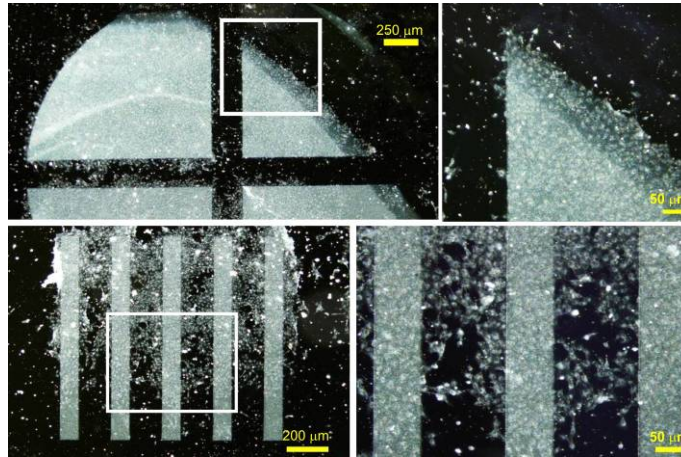
A leválasztás során a többféle mintázat eléréséhez egy réz maszkot rögzítettem a szilícium szubsztrátokra, s minden réteg esetén 25.000 lézerimpulzust alkalmaztam (IV.49. ábra).



IV. 49. ábra A PLD során alkalmazott réz kontakt maszk

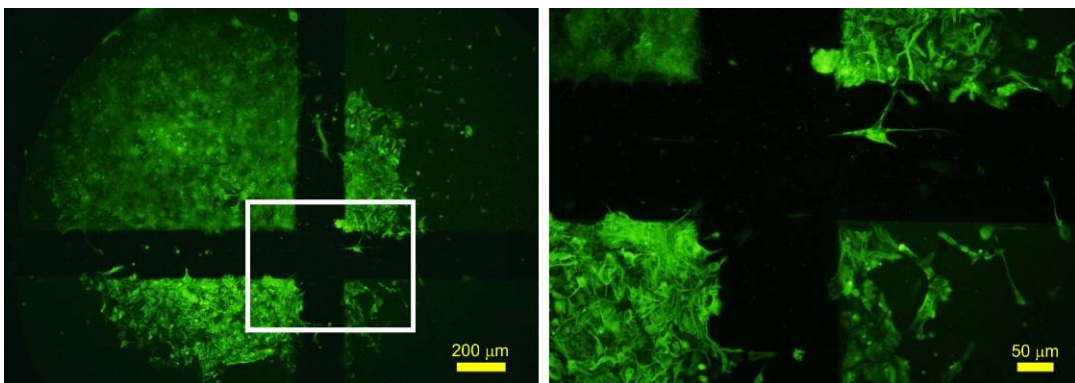
A leválasztott rétegek sejtmegtapadási hatékonyságát többféle sejttel is megvizsgáltuk Dr. Nógrádi Antal kollégámmal. Az alkalmazott sejttípusok a következők voltak: patkány asztrogia, neuroblasztóma, sertés endotélium és egér neuroektodermális sejtek. Ezek koncentrációja 5×10^5 sejt/ml volt. A táptalajban elkevert sejteket 3-4 mm átmérőjű cseppekben, egymástól elkülönítve helyeztük el a különböző rétegekkel bevont szilícium lapokon. A sejtek láthatóvá tételéhez megfelelő antitesteket és immunhisztokémiát alkalmaztunk. A mintákat egy Olympus BX50 mikroszkóppal vizsgáltuk, s egy hozzá kapcsolt Olympus DP70 digitális kamerával fényképeztük. A képek elkészítésénél és kiértékelésénél Dr. Szabó András biológus kollégám volt a segítségemre.

A IV.50. ábra mutatja sertés endotélium sejtek specifikus és irányított megtapadását, növekedését endoteliális sejtmeztapadást elősegítő adalékot tartalmazó réteg esetén. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a sejtek a leválasztott rétegen tapadnak meg, elkezdnek növekedni, szaporodni, s elegendően nagy sűrűség esetén viszont már kinyúlnak a fedetlen szilícium felület felé is [151].



IV.50. ábra Sertés endotélium sejtek endoteliális sejtmeztapadást elősegítő adalékot tartalmazó keményítő vékonyréteg struktúráján

Hasonló viselkedést lehetett megfigyelni neuroblasztóma és egér neuroektodermális sejtek esetén is kollagént, illetve Na-alginátot tartalmazó vékonyrétegek kölcsönhatásának vizsgálata során. Az asztroglia sejtek kevésbé intenzív növekedést, szaporodást mutattak, azonban ezek irányítottsága, viselkedése is hasonló volt a korábbi sejtek esetén megfigyeltékhez (IV.51. ábra) [151].



IV.51. ábra Asztroglia sejtek kontakt maszkon keresztül leválasztott kollagén-keményítő vékonyrétegen

Kontrollképpen tiszta keményítőből is készítettem hasonló körülmények között vékonyrétegeket, s ezekre is tettünk sejtet táplajokat. A kísérletek azt mutatták, hogy a tiszta keményítőből álló rétegek semmilyen módon nem befolyásolták a sejtek megtapadását,

fejlődését, szaporodását. Ebből arra következtettem, hogy a PLD során sikerrel választottam le a sejtmegtapadást elősegítő anyagokat is a keményítővel együtt.

Megállapítható tehát, hogy a PLD módszerrel lehetséges sejtmegtapadást elősegítő anyagokból megfelelőképpen strukturizált vékonyréteget leválasztani mindenféle egyéb kémiai, biológia kiegészítő adalék nélkül. A sejttenyésztési kísérletek pedig azt bizonyították, hogy ezek segítségével lehetőség van adott típusú sejtekből álló mintázatok kialakítására. Ennek során a sejtek nincsenek kitéve semmilyen mechanikai, fotokémiai, termális károsító hatásnak. Az eredményeknek leginkább a sejtalapú bioszenzorok előállítása, élő szövetek építése és sérült szövetek helyreállítása területein lehet óriási jelentősége a jövőben, de a gyakorlati életbe való bevezetéséhez még számos területre kiterjedő vizsgálatsorozat elvégzése szükséges.

IV.2. Biológiai objektumok abszorbeáló réteggel elősegített kontrollált nano- és femtoszekundumos lézeres mozgatása, átvitele

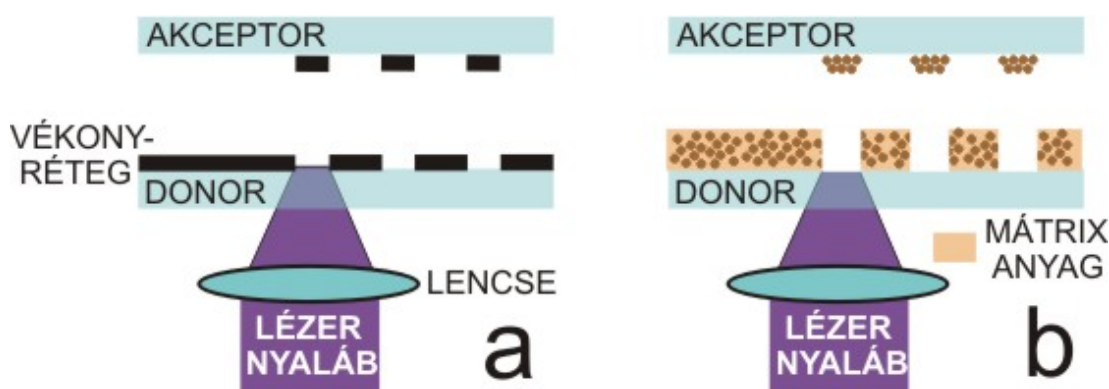
IV.2.1. AFA-LIFT

A vékonyrétegek előállítása mellett az impulzuslézereknek a biológiai anyagokkal kapcsolatos másik ígéretes „megmunkálási” módszere a lézeres átvitel, melynek lehetőségei meghaladják a hagyományos eljárásokét. A biológiai anyagokból és élő sejtekből álló heterogén mátrixok és rétegek kialakítása elengedhetetlen feltétele a szövetépítésre (*tissue engineering*) alkalmas háromdimenziós struktúrák [152,153], szövet alapú érzékelő eszközök [154-157], valamint alap- és alkalmazott kutatási célokat szolgáló rendezett mikroorganizmus kultúrák előállításának [158]. A felsorolt alkalmazási lehetőségek közül talán a szövetépítés tűnik a leginkább figyelemre méltónak. A szövettervezés és építés a különböző betegségek és sérülések kezelését célzó új technikák egy speciális, jelentős fejlődést mutató csoportja. Magába foglalja a molekuláris- és sejtbiológiai módszereket, melyeket a legkorszerűbb anyagtudománnyal, lézeres technológiákkal ötvöznak. A lézereken alapuló eljárások alkalmazása a szövetépítés területén új módszerek kifejlesztését tette lehetővé. A felhasznált biológiai elemek és élő sejtek az építendő, vagy javítandó szövetek, szövetrészek típusa szerint különbözőek lehetnek. Amennyiben különböző sejttypusok tenyésztetét írógépszalaghoz hasonlóan lehetne felhasználni teljes szövetek rétegenkénti felépítéséhez, óriási lehetőségek nyílnának az orvostudomány számára.

A szakirodalomban élő sejtekből és biológiai anyagokból álló mintázatok kialakítására többféle módszerről is beszámoltak, mint például monomolekuláris rétegek (self-assembling monolayers), mikro-érintkezős nyomtatás (microcontact printing), litográfia (soft lithography), melyekkel sejt-specifikus adhéziójú felületi mintázatok alakítottak ki sejteknek oldatokból történő befogására [159-161]. Specifikus sejtek elkülöníthetők nagyobb mikrotómiás szövetrészből lézeres eljárással (laser capture microdissection), azonban ez nem alkalmazható élő sejtek szeparációjára [162,163].

Mint azt az „Irodalmi áttekintés” fejezetben láttuk, az előreirányuló lézeres átvitel (Laser Induced Forward Transfer, LIFT) egy direkt-írási eljárás, melynek során egy átlátszó hordozó felületén levő abszorbeáló vékonyréteg (donor) az őt a hordozón keresztül érő lézerimpulzus hatására átmásolódik a vele szemben elhelyezett felületre (akceptor) (IV.52.a ábra) [57-59]. A LIFT képezi az alapját a mátrixanyaggal elősegített impulzuslézeres

párologtatásos direktírás (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation Direct Write, MAPLE DW) eljárásnak, melyet eredetileg elektronikai eszközök kompozit anyagokból való előállítására fejlesztettek ki, azonban alkalmasnak mutatkozott sejt- és biológiai anyag mintázatok előállítására is [69]. A $\sim 10\ \mu\text{m}$ térbeli feloldás megvalósítására alkalmas folyamat során az átvinni kívánt „hasznos” anyagot egy, az alkalmazott lézer hullámhosszán nagy abszorpciós tényezővel rendelkező mátrix anyaggal keverik (IV.52.b ábra). A Barron és munkatársai által kifejlesztett egyik lézeres eljárás (Biological Laser Printing, BioLP) alkalmasnak bizonyult embrionális karcinóma sejtek átvitelére [164].



IV.52. ábra Az előreirányuló lézeres átvitelre (LIFT) és a MAPLE-DW-re szolgáló elrendezés vázlata.

Feltételeztem, hogy az abszorbens vékonyréteggel bevont szubsztrát felületére felvitt biológiai anyag a lézeres átvitel során megőrizheti struktúráját, életképességét megfelelő paraméterek alkalmazása esetén. A MAPLE DW-től eltérően ebben az esetben az átvendő anyagot nem kell nagy abszorpciós tényezőjű mátrixba ágyazni, ami sok esetben amúgy is nehezen megvalósítható. Természetesen élő sejtek esetén szükség van tápoldat alkalmazására, ez azonban a mi esetünkben nem az abszorbens szerepét tölti be, mint a MAPLE-DW esetében. Ennek megfelelően kidolgoztam egy, általam abszorbeáló réteggel elősegített előreirányuló lézeres átvitelnek (Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer, AFA-LIFT) nevezett eljárást biológiai minták kontrollált átvitelére. Az abszorbens réteg szerepe hasonló, mint a szakirodalomban Dynamic Release Layernek nevezetté, mely nem válik le a hordozóról, hanem az elnyelt lézerenergia hatására mintegy ”ledobja” magáról a ráhelyezett biológiai anyagot [165]. Nagy abszorpciójú vékonyréteget alkalmazva, melynek vastagsága meghaladja a fény behatolási mélyégét, a fény roncsoló hatása minimalizálható és az átvitt idegen anyag mennyisége jelentősen csökkenthető.

Kísérleteim célja elsősorban az volt, hogy bebizonyítsam, az eljárás alkalmas biológiai anyagok, például élő sejtek átmásolására, úgy, hogy azok a folyamat során megőrizték életképességüket, biológiai tulajdonságaikat. Másodsorban magát a másolási folyamatot, annak időbeli lezajlását, illetve a közben bekövetkező hőmérsékletváltozásokat kívántam tanulmányozni az eljárás pontosabb megértéséhez, leírásához.

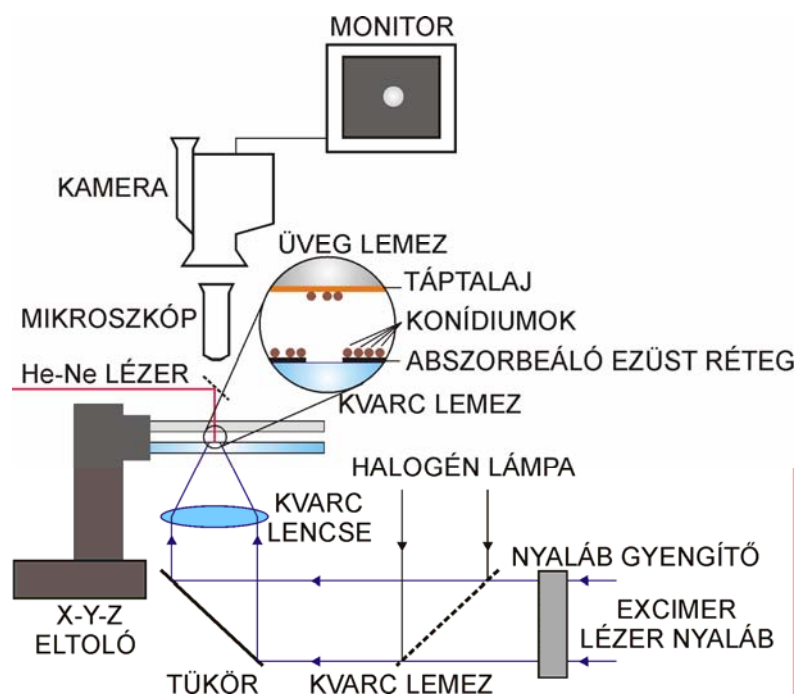
IV.2.2. *Trichoderma* spórák lézeres átvitele

A *Trichoderma* nemzetség tagjai elterjedt talajlakó fonalasgombák. Számtalan izolátum rendelkezik kiemelkedő extracelluláris lebontóenzim termelő képességgel, mely tulajdonság megfelel ökológiai szerepüknek, a növényi hulladékok lebontásában való részvételüknek [166]. Extracelluláris enzimeikkel a *Trichoderma* törzsek képesek megtámadni és parazitálni más gombákat, megalapozva ezzel a mezőgazdaságban növénypatogén gombákkal szemben biokontroll szervezetként való alkalmazásukat [167,168]. Annak ellenére, hogy a trichodermák talajlakó erjesztő organizmusok, bizonyos esetekben az emberi szervezetben helyi fertőzést, ritka esetben halálos betegségeket okozhatnak [169].

Abszorbeáló anyagnak 50 nm vastagságú ezüst vékonyréteget vittem fel vákuumpárolgatással kvarc hordozóra. Az ezüstréteg felületére *Trichoderma longibrachiatum* törzs desztillált vízben diszpergált konídiumait helyeztünk el Dr. Antal Zsuzsanna mikrobiológus kollégámmal $2530 \pm 460/\text{mm}^2$ sűrűségben, majd levegőn megszárítottuk. Az AFA-LIFT eljárás során az ezüstréteg elnyeli a lézerimpulzus energiáját, melyet mozgási energiává alakítva magával ragadja a spórákat. Mivel a kísérletek során alkalmazott 248 nm-es fény behatolási mélysége az ezüstben körülbelül 14 nm, ($\alpha=71 \text{ 1}/\mu\text{m}$) az alkalmazott rétegvastagság elegendő ahhoz, hogy megvédje a spórákat a lézerfény direkt roncsoló hatásától. A donor kvarclappal szemben, tőle 1 mm távolságra helyezkedett el egy táptalajjal bevont üveglap (akceptor).

Egy KrF excimer lézer ($\lambda=248 \text{ nm}$, FWHM=30 ns) nyalábjának kör alakban kivágott homogén részét a kvarclapon keresztül az ezüst rétegre fókuszáltam (IV.53. ábra). A besugárzott felület átlagos nagysága $0,08 \text{ mm}^2$ volt, az alkalmazott energiasűrűséget 35 és $2600 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ között változtattam. A lézer energiáját egy forgatható dielektrikum szűrővel szabályoztam és impulzusról impulzusra mértem. A donor-akceptor párt egy halogén lámpának a lézerrel egy vonalban haladó fényével világítottam meg és az ellentétes oldalról egy mikroszkóp-kamera rendszerrel figyeltem. A kísérleteket normál atmoszférán,

szobahőmérsékleten végeztem. Átvitel után a spórákat tartalmazó táptalajos üveglapot 25 °C-os nedves kamrába helyeztem a túlélési képesség vizsgálatához, a csírázás megindításához.

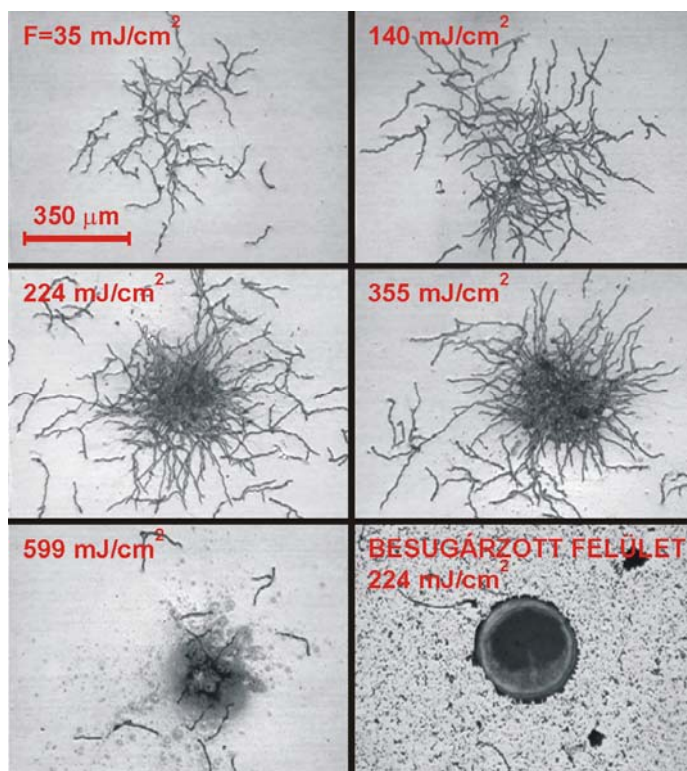


IV.53. ábra Biológiai anyagok átvitelére alkalmazott AFA-LIFT elrendezés vázlatja.

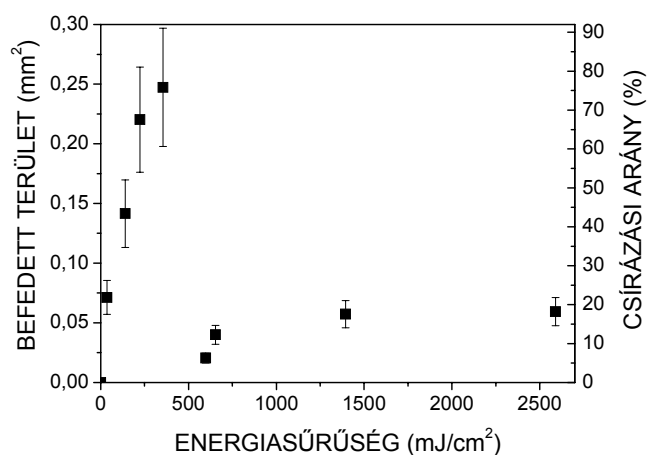
20 óra csírázási idő elteltével optikai mikroszkóppal megvizsgáltam az akceptor lapok felületét. Amint a IV.54. ábra is mutatja, gombacsírákból álló szigetek voltak megfigyelhetők a táptalajon a lézerrel besugárzott területek elhelyezkedésének megfelelő helyeken. A csírák sűrűsége függött az alkalmazott energiasűrűségtől. Látható, hogy a csírák jelentősebb része a besugárzott foltnak megfelelő területen volt, míg néhány spóra nagyobb területen szóródott szét. A donor-akceptor távolság csökkentése valószínűleg a szóródási terület csökkenését eredményezné. Átvitt ezüst cseppek az optikai mikroszkóppal nem voltak megfigyelhetők. Az ábra jobb alsó képe a donor lap felületét mutatja 224 mJ/cm² energiasűrűségű impulzussal való besugárzás után, az apró sötét pontok a konídiumok.

A Scion Image képfeldolgozó program segítségével meghatároztam a csírák által borított felületek nagyságát különböző energiasűrűségek esetén (IV.55. ábra). Az energiasűrűség növelésével a befedett terület ugrásszerűen megnőtt, elérve maximumát, 0,25 mm²-t 355 mJ/cm²-nél. Az energiasűrűség további növelésével a fedett terület hirtelen lecsökken egy megközelítőleg konstans, 0,06 mm² értékre. E hirtelen csökkenésnek az oka nagy valószínűséggel az, hogy a nagy energiájú lézersugárzás nemcsak eltávolítja az ezüst réteget, hanem ugyanakkor már roncsolja a spórákat és az akceptor felületét is. Az átvitt csíráképes spórák számának meghatározásához megmértem néhány jól elkülöníthető csíra

területét és ezzel elosztottam a teljes lefedett területet. Ez valójában alábecsüli a valós értéket, mivel az egymást fedő csíráképződményeket nem lehetett figyelembe venni. A donor felületén meghatározva a besugárzott területnek megfelelő spóraszámot, megkaptam a csírázási arányt, amely 355 mJ/cm^2 -nél meghaladta a 75 %-ot. A csírázási arány magába foglalja mind az átvitel hatékonyságát, mind pedig az átvitt spórák csírákéességének megőrzését [170,171].



IV.54. ábra Az akceptor lap felületéről 20 h csírázási idő elteltével készített optikai mikroszkópos képek. A jobb alsó kép a donor lap felületét mutatja 224 mJ/cm^2 energiasűrűségű besugárzás után.



IV.55. ábra Különböző energiasűrűséggel átvitt spórák csírái által befedett terület nagysága és az ebből számított csírázási arány.

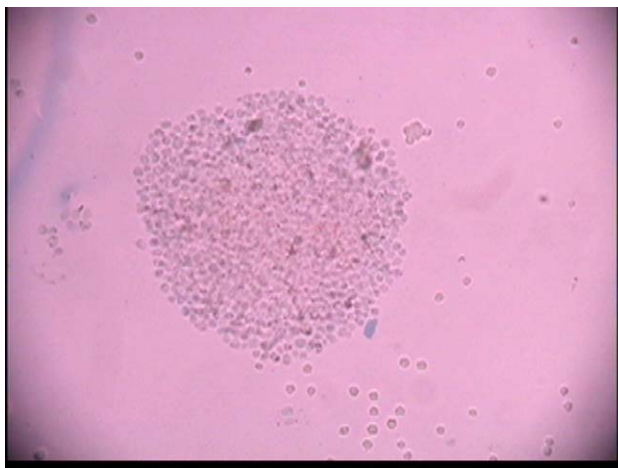
Az AFA-LIFT folyamatának jobb megértéséhez az ezüst hőmérsékletének térbeli és időbeli eloszlását vizsgáltam a hővezetési egyenlet numerikus megoldásával, figyelembe véve a halmazállapot változást, a fizikai paraméterek hőmérséklet-függését, valamint az ezüsttel érintkező levegőréteg és kvarc hővezetését. Mivel az ezüst réteg vastagsága nagyságrendekkel kisebb, mint a besugárzott terület nagysága, elég volt csak az egydimenziós hővezetési egyenlettel számolni. A kvarclap és ezüst réteg együttes reflexióképessége 36% volt 248 nm-en. A számításokat a kísérletek során alkalmazott legkisebb (35 mJ/cm^2), valamint a legnagyobb csírázási arányt eredményező (355 mJ/cm^2) energiasűrűségekre végeztem el. Az elért maximális hőmérsékletre a két esetben 447°C (50 ns-mal az impulzus kezdete után) és 2210°C (33 ns-nál) adódott. Ez azt jelenti, hogy az első esetben az abszorbeáló réteg nem olvadt meg, míg a másodikban el is forrt. Azonban a kísérletek eredményei szerint az ezüstréteg mindkét esetben elhagyta a kvarclap felszínét [170]. Ez azzal magyarázható, hogy a kvarc gáztalanítási hőmérséklete sokkal alacsonyabb az ezüst olvadáspontjánál, és már az alacsony energiasűrűségű lézersugárzás hatására kialakuló gázzéteg nyomása [172,173] is összeroncsolja az ezüstöt és a rajta levő spórákkal együtt „lefújja” a kvarc felületéről. Magas energiasűrűségeknél az elpárolgó ezüst ragadja magával a spórákat és viszi át az akceptor felületre.

IV.2.3. Élő sejtek lézeres átvitele

Az eddigi eredményes lézeres átviteli kísérletek során rezisztens sejt vonalakat vagy rákos sejteket alkalmaztak. Ezért felmerül a kérdés, hogy vajon normál, érzékenyebb, frissen izolált sejtek sikeresen átvihetők-e, és ezek megőrzik-e szaporodóképességüket és fenotípusukat hosszabb idő (néhány hét) elteltével is. Ezért ezen kísérleteim célja különböző típusú, frissen izolált élő sejtek AFA-LIFT-tel történő átvitelének vizsgálata, külön tekintettel a túlélésre és a fenotípus kialakulására in vitro környezetben. Kísérleteim során patkány Schwann és asztrogliá (idegrendszeri sejtek), valamint sertés szemlencse epitélium sejteket vizsgáltam. Kísérleteimhez a IV.2.2. fejezetben bemutatott AFA-LIFT elrendezést alkalmaztam (IV.53. ábra). A donor lap 100 nm vastagságú ezüst réteggel bevont felszínére Dr. Nógrádi Antal orvos kollégámmal $2\text{--}6 \times 10^6$ sejt/ml koncentrációjú oldatot szélesztettem 140-160 μm vastagságban. A vele szemben 0,6 mm távolságra elhelyezett akceptor lap felszínét vékony zselatin réteggel vontam be a sejtek megtapadásának elősegítésére és az akceptor lappal való ütközés erejének csillapítására. A 360 mJ/cm^2 energiasűrűséggel besugárzott terület nagysága $0,07 \text{ mm}^2$ volt. Az energiasűrűséget úgy választottam meg, hogy az átvitt folyadékcsepp

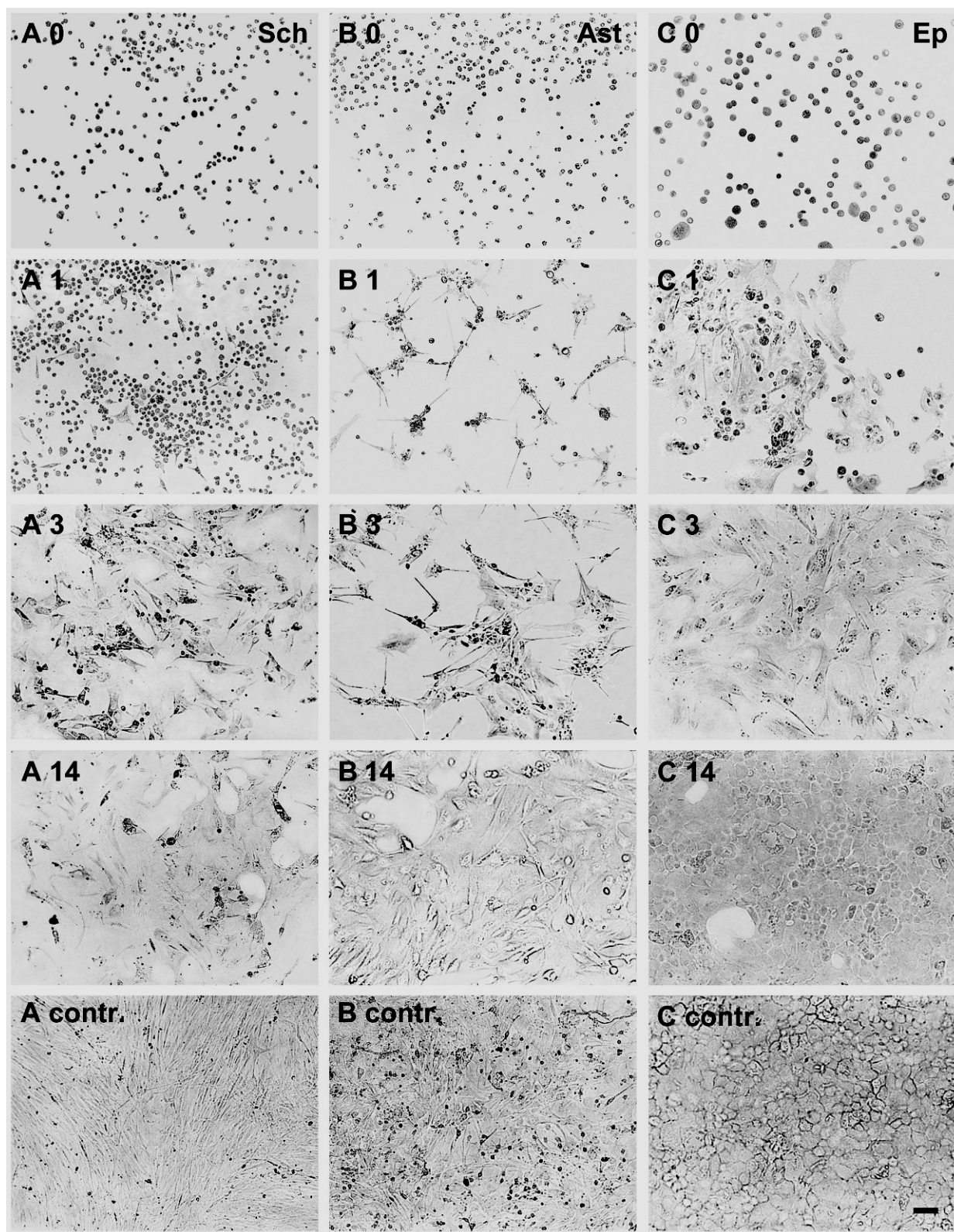
mérete a legkisebb legyen úgy, hogy a lézer impulzusonkénti energiájának 10 %-os fluktuációja ne befolyásolja számottevően az átvitel folyamatát. A sejtek életképességét az átvitel előtt és után 5%-os tripánkék oldattal vizsgáltuk. Az elpusztult sejteket az oldat megfesti, míg az élő sejtek kipumpálják magukból a festékanyagot. A sejteket rögtön az átvitel után tápoldatba helyeztük, naponta optikai mikroszkóppal figyeltük meg és fényképeket készítettünk.

A donor lapon az átvitt sejtek jól elkülönülő foltokat alkottak. A IV.56. ábrán átvitt asztroglia sejtek egy csoportja figyelhető meg. Az elszórtan látható sejtek a tápoldatba helyezéskor váltak ki a „sejtszigetből”. A tripánkéssel végzett tesztek azt mutatták, hogy közvetlenül átvitel előtt mindhárom sejttypusnál az élő sejtek aránya 98-99 %, közvetlenül átvitel után 80-85 % volt.



IV.56. ábra AFA-LIFT eljárással átvitt asztroglia sejtek csoportja. Az elkülönült sejtek nem jól tapadtak meg és a tápoldatba helyezéskor felváltak a felszínről, elsodródtak.

A IV.57. ábra három oszlopában a Schwann (A), az asztroglia (B) és az epitélium (C) sejtekről különböző idők elteltével készült felvételek láthatók.



IV.57. ábra Átvitt Schwann (A) asztroglia (B) és szemlencse epítélum (C) sejtekről különböző idő (0, 1, 3, 14 nap)elteltével készített optikai mikroszkópos felvételek. Az alsó sor a kontroll tenyészeteket mutatja.

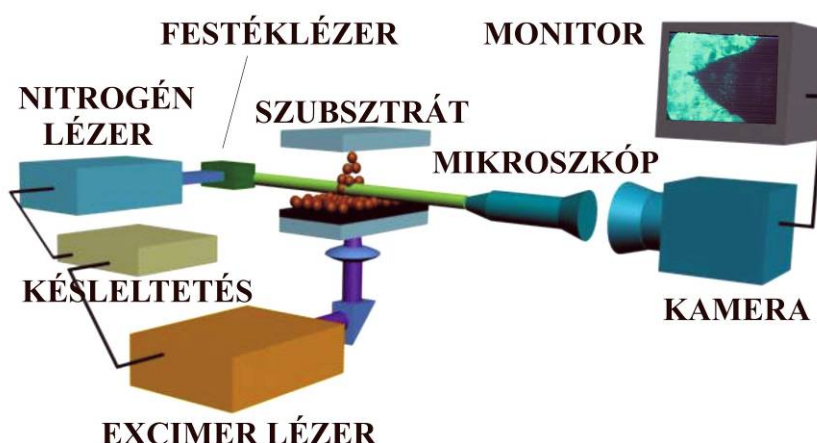
A sejtek az átvitel napján még kör alakúak voltak (A0–C0), azonban már egy nap után szaporodni és differenciálódni kezdtek (A1–C1). Három nap elteltével a szinte kizárólag jól

differentiálódott sejtek mellett csak elszórtan voltak megfigyelhetők degenerálódott sejtek (A3–C3). Egy héttel az átvitel után a sejt kultúrák szinte teljesen összefüggő réteget alkottak, mely a második hét elteltével is fennmaradt (A14–C14). Ennyi idő elteltével degenerált sejtek már nem voltak megfigyelhetők. Összehasonlításként mindegyik sejt típusból a hasonló körülmények között tenyésztett kontroll kultúrák gyorsabban nőttek és már három nap után összefüggő réteget alkottak. Két hét elteltével az átvitt és a kontroll sejttenyészetek közötti különbség az epitélium sejtek esetében elhanyagolható volt, míg a Schwann és asztroglia sejtek esetén a kontroll minta nagyobb sejt sűrűséget mutatott (Acontr–Ccontr) [174,175].

IV.2.4. Az anyagátviteli folyamatok időfelbontásos vizsgálata

Ismerve az impulzuslézerekkel keltett folyamatok gyors lefolyását, felmerült a kérdés, hogy a lézeres átvitel során milyen mechanikai hatásoknak vannak kitéve a biológiai anyagok. Hiszen sokak számára már az is meglepő lehetett, hogy az általában jó tűrőképességű spórák mellett a sokkal érzékenyebb élő sejtek is túléltek a lézeres átvitelt. Ezért időfelbontásos fényképezést alkalmaztam az átvitel folyamatának feltérképezésére és a biológiai anyagokat érő hatások megbecsülésére.

Az AFA-LIFT folyamatának időbeli vizsgálatához az általam korábban már alkalmazott gyorsfényképező elrendezést kombináltam az átvitelre használt rendszerrel a IV.58. ábrán látható módon.

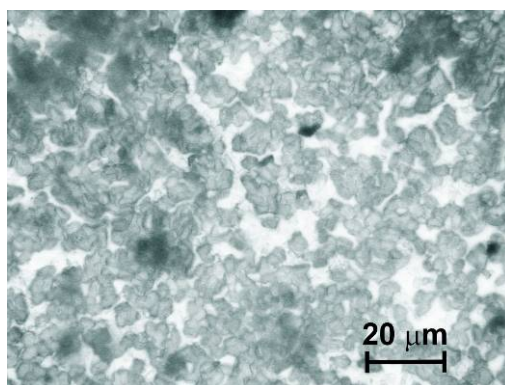


IV.58. ábra Az AFA-LIFT folyamatának vizsgálatára használt gyorsfényképező rendszer vázlata.

Kísérleteim során megvizsgáltam mind a gomba spórák, mind pedig a sejtek átvitelének folyamatát az előző fejezetekben alkalmazott paraméterek megtartásával. A *Trichoderma* spórák átviteléhez most is 50 nm vastag ezüstréteget alkalmaztam abszorbeáló anyagként. A besugárzott terület nagysága $0,08 \text{ mm}^2$, az energiasűrűség 355 mJ/cm^2 a donor és akceptor lapok közötti távolság 1 mm volt. A sejtekkel végzett kísérletek során ebben az esetben is 100 nm vastag ezüst réteget alkalmaztam, erre szélesztve $\sim 150 \text{ }\mu\text{m}$ vastagságban a sejteket tartalmazó oldatot. A lézer $0,07 \text{ mm}^2$ területet sugárzott be 360 mJ/cm^2 energiasűrűséggel, a donor-akceptor távolság 0,6 mm volt. A lejátszódó folyamatokat az excimer lézer impulzust követő $100 \text{ }\mu\text{s}$ -ig követtem nyomon.

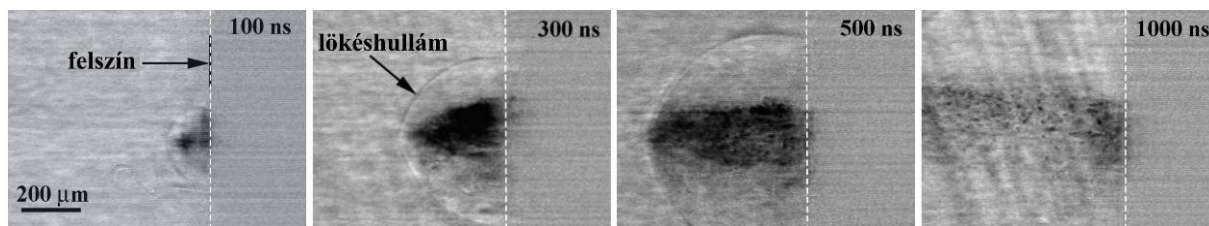
a) *Trichoderma* spórák átvitele

Ahhoz, hogy a spórák könnyebben észrevehetőek legyenek, a donor felületére nagy sűrűségben helyeztük el ezeket (IV.59. ábra).

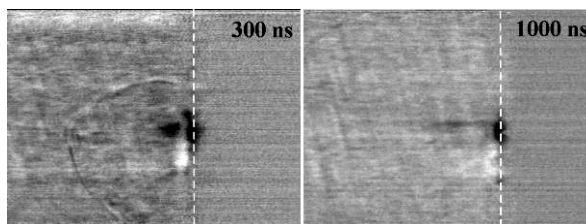


IV.59. ábra A donor lap spórákkal borított felületéről készített optikai mikroszkópos felvétel.

A IV.60. ábrán az eltávozó anyagról különböző időpillanatokban készült felvételek láthatók. Az excimer lézer impulzusa nélküli képkockát háttérként kivontam mindegyik képből. A felvételek szerint az anyageltávozás $\sim 50 \text{ ns}$ -mal az excimer lézer impulzusa után indul meg, szorosan követi a kialakult lökéshullámot és körülbelül $10 \text{ }\mu\text{s}$ -ig tart. A felvételeken konídium klaszterek figyelhetők meg, különálló spórák nem, mivel az egy képpontnak megfelelő méret $6 \text{ }\mu\text{m}$ volt. Az ezüst és a spórák elkülöníthetősége érdekében a kísérletet megismételtem spórák nélkül. Amint a IV.61. ábra mutatja jelentős anyageltávozás ebben az esetben nem volt megfigyelhető, csak a kialakult lökéshullám utalt az elpárolgó ezüstre, ami azt jelenti, hogy az előző fényképeken látható anyagkilövellés majdnem kizárólag az eltávozó spóráknak tulajdonítható.

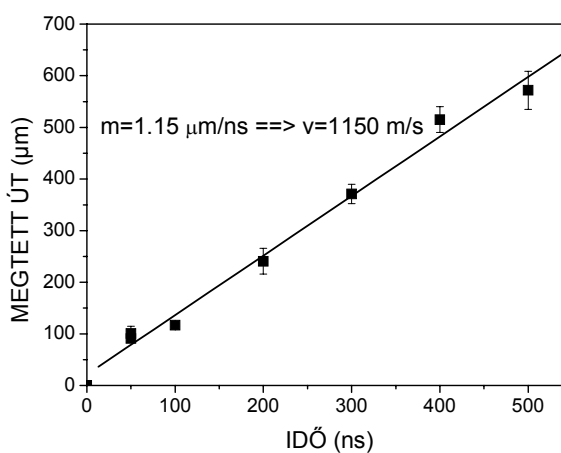


IV.60. ábra Anyageltávozás folyamata a spórákkal borított donor felületéről.



IV.61. ábra Spórák hiányában nem látszik jelentős anyageltávozás. Az elpárolgó ezüstre a lökéshullám jelenléte utal (bal oldali kép).

Megmérve a spórák által megtett utat az idő függvényében (IV.62. ábra), meghatároztam az eltávozás sebességét, amire 1150 m/s adódott, ami a levegőbeli hangsebesség háromszorosa [176].



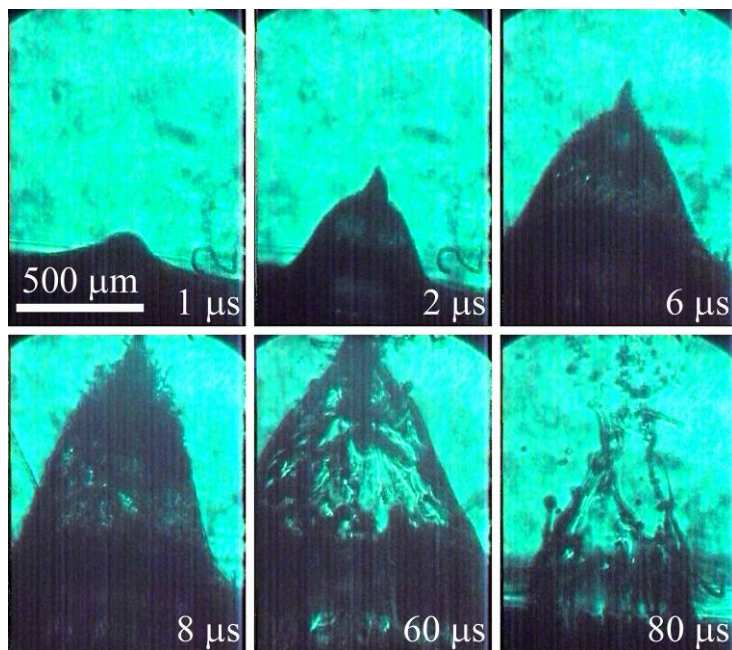
IV.62. ábra A spórák távolsága a donor felülettől (megtett út) az idő függvényében.

A mért adatok alapján, 50 ns ideig tartó kezdeti gyorsulással számolva a konídiumok átlagos gyorsulása megközelítőleg $10^9 \times g$. Ilyen gyorsulás a spórákat drasztikus mechanikai hatásoknak teszi ki. A földi élet eredetét vizsgáló kutatások már kimutatták, hogy bizonyos típusú baktériumok és spórák képesek szélsőséges körülményeket (magas/alacsony nyomás, és hőmérséklet, gyorsulás, UV sugárzás, stb.) elviselni. Ezekben a kísérletekben nagy gyorsulást, maximum 10^5 - $10^6 \times g$ -t, hoztak létre robbanással, lökéshullámmal, ultracentrifugával, lövedékekkel stb. [177-180]. Mindegyik nagyságrendekkel alatta marad az

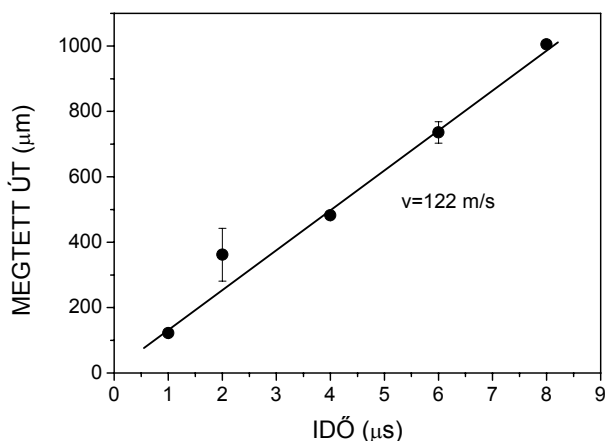
általam becsült értéknek. Kísérleteim bebizonyították, hogy a spórák mégis túlélnek ezt az extrém értéket, ezt segítheti a nagyon rövid ideig tartó gyorsulási szakasz (<100 ns), a spórák kis mérete és az, hogy az elforró ezüst által kifejtett erő egyenletesebben oszlik meg a spóra felszínén, mintha egy szilárd tárggyal ütközne. Emellett pedig az akceptor felületen levő rugalmas táptalaj nagymértékben csillapítja a becsapódás erejét [176].

b) Élő sejtek lézeres átvitele

Az anyagkilövellés sebességének meghatározásához eltávolítottam az akceptor lapot, hogy ne zavarja a megfigyelést. A felvételek szerint (IV.63. ábra) az anyageltávozás 500 ns környékén indul meg és ~ 100 μ s-ig tart. A folyadéknyúlvány csúcsa és a folyadék felszíne közötti távolság ismeretében meghatároztam (IV.64. ábra) a kilövellés sebességét, amire 122 m/s-ot kaptam, lényegesen kisebb értéket, mint a gomba spórák esetén [174].

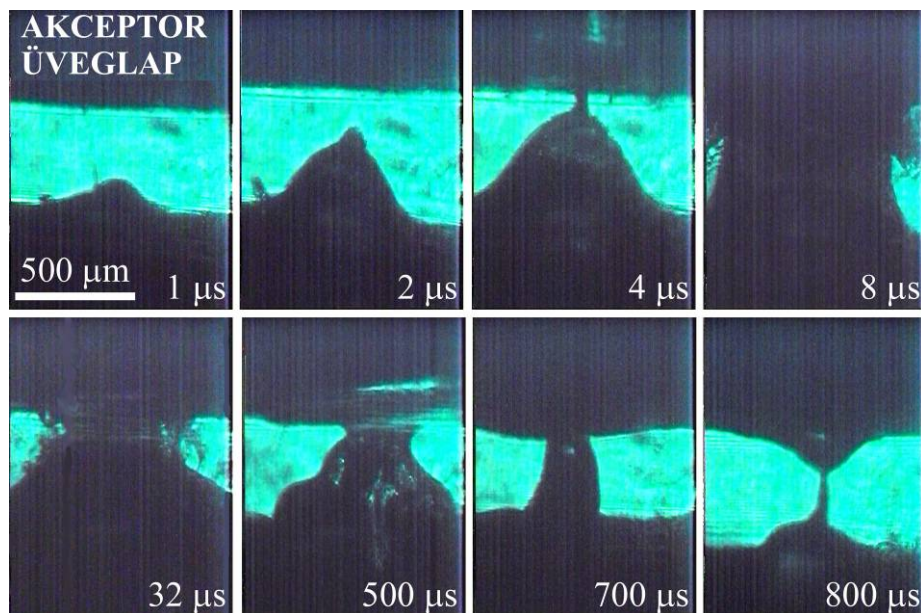


IV.63. ábra AFA-LIFT során Asztroglia sejteket tartalmazó oldat kilövelléséről készített képsorozat. Az akceptor lapot eltávolítottam a zavartalan megfigyelés érdekében.



IV.64. ábra A folyadéknyúlványnak a folyadék felszínétől mért magassága (megtett út) az idő függvényében.

A gyorsfényképező rendszerrel megvizsgáltam az átvitel folyamatát az akceptor lap jelenlétében is (IV.65. ábra). A folyadéknyúlvány körülbelül 4 μs-mal az excimer lézer impulzusa után éri el az akceptor felszínét, ahonnan a folyadék egy kis része visszaverődik (8 μs-nál készült kép). A kezdetben gyors folyadékáramlás néhányszor 10 μs alatt lelassul, majd visszaáramlás indul meg. A donor és akceptor lapok közötti „összeköttetés” 1 ms körül szakad meg, a folyadéknyúlvány visszasimul a donor felszínbe és az akceptor felszínén egy folyadékcsepp marad.

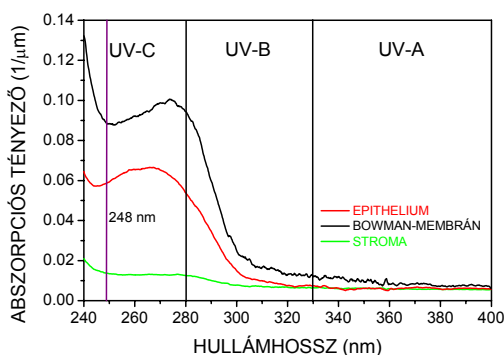


IV.65. ábra Sejtek AFA-LIFT-tel történő átvitelének folyamata.

Feltételezve, hogy a gyorsulási periódus, amire a folyadéknyúlvány eléri állandó sebességét kisebb, mint 1 μs, a legkisebb átlagos gyorsulása a sejteknek $10^7 \times g$. Az átvitt sejteknek az akceptor felületére történő becsapódáskor bekövetkező lassulását Ringeisen és

munkatársai $10^6 \times g$ -nek becsülték [71]. Ez azt mutatja, hogy a vizsgált sejtek nagy része extrém nagy gyorsulásokat képes elviselni a kezdeti gyorsulási és a becsapódási szakaszban lényeges roncsolódás nélkül. Ez valószínűleg a gyorsulások igen rövid, néhányszor száz nanoszekundumos idejének köszönhető. Az átvitel sikerességét alapvetően két tényező befolyásolhatja: az áttapadás és a túlélés. Feltételezésem szerint az elpusztult sejtek a folyadéknyúlványok elejében levő, az akceptor lapnak a legnagyobb sebességgel, legvédtelenebbül csapódó sejtek közül kerülnek ki. A bentebb elhelyezkedő sejtek legnagyobb része túléli az ütközést, azonban azok, amelyeknek nem elég nagy a sebességük ahhoz, hogy a felülethez tapadjanak, a visszahúzódó folyadéknyúlvánnyal visszakerülnek a donor felületre, vagy a tápoldatba helyezéskor lemosódnak az akceptor felületéről.

A sejtátviteli kísérleteink távlati célja az, hogy az átvitt sejtek ne csak túléljék az eljárást és megtartsák szaporodóképességüket, hanem képesek legyenek kapcsolódni is egymáshoz, azaz ne csak önálló sejtek halmazát alakítsuk ki, hanem egymással együttműködő, kommunikáló sejttrendszer, azaz szövetet. Első lépésként az emberi szaruhártyának megfelelő szövetek így módon történő „előállítását” céloztam meg. Dr. Nógrádi Antal orvos kollégámmal (SZTE Szemészeti Klinika) megkíséreltük a sejtek sejtenyészetből való direkt átvitelét LIFT módszerrel, azaz abszorbeáló réteg nél. Ehhez előbb ki kellett mérnem az egyes szaruhártya-alkotó rétegek abszorpciós tulajdonságait az UV tartományon (66. ábra).



IV.66. ábra Humán szaruhártya alkotó szöveteinek abszorpciós együtthatója az UV tartományon.

Megállapítottam, hogy a különböző rétegek UV abszorpciója nem túl kedvező a nanoszekundumos KrF excimer lézeres átvitel szempontjából ($\alpha < 1000$ 1/cm) [181]. Ezért femtoszekundumos lézerrel próbálkoztunk. A tapasztalatok azonban azt mutatták, hogy a sejtek nem élték túl a direkt lézeres besugárzást, így nem kerülhetjük el a köztes abszorbeáló

réteg alkalmazását ebben az esetben sem. Viszont az abszorpció mérések eredményeit fel lehetett használni a szaruhártya UV védelmi szerepének pontos tisztázására, ami egyes szembetegségek, károsodások okának kiderítése, megelőzése szempontjából igen jelentős járulékos eredménye ezen munkámnak.

IV.2.5. Átlátszó anyagok lézerindukált hátsóoldali száraz maratása

a) Átlátszó anyagok lézerindukált hátsóoldali nedves maratása (LIBWE)

Az AFA-LIFT-es kísérleteim során figyeltem fel a következő érdekes jelenségre. Egy átviteli sorozat után a kvarclap újbóli felhasználásához, fém filmmel való bevonásához le kellett takarítanom a rajta maradt sejtkultúrát, tápfolyadékot, s nem utolsósorban a le nem lőtt ezüst réteget. Ez utóbbi műveletet salétromsavval hajtottam végre. Megvizsgálva a kvarclapot, azt tapasztaltam, hogy a besugárzott helyeken szemmel látható, a megvilágított területnek megfelelő méretű elváltozások jöttek létre. Profilométer segítségével kimutattam, hogy ezeken a helyeken maratódás következett be, azaz ezzel az eljárással nem csak anyagátvitelt hajtottam végre, hanem egyúttal meg is munkáltam a kvarc hordozót, mégpedig egy olyan lézerrel, melynek hullámhossza (248 nm) átlátszó. Ezzel az átlátszó anyagok egy új, indirekt lézeres megmunkálási módszerét fedeztem fel, s ebben a fejezetben az ezzel kapcsolatos vizsgálataimat foglaltam össze.

A mikrométeres mérettartományban megmunkált átlátszó anyagok (kvarc (amorf ill. kristályos), zafír, MgF_2 , CaF_2 , BaF_2) számos optikai- és mikro-optikai alkalmazási lehetőséggel rendelkeznek, melyeknek köszönhetően a megmunkálási eljárásaik jelenleg is a fizika egy intenzíven kutatott területét képezik. A legfontosabb alkalmazási területek közé többek között mikrolencse-sorok (lézernyaláb-homogenizátorok), Fresnel-lencsék előállítás, magas roncsolási küszöbvel rendelkező, ellenálló rácsok készítése tartozik. Létezik közvetlen és közvetett megmunkálási módjuk is aszerint, hogy a megmunkáló lézernyaláb önmagában, közvetlenül távolítja el a céltárgy felszínének kicsiny részét, vagy valamilyen segédanyagot használva, közvetve. A közvetlen megmunkálási módok legnagyobb hátrányai, hogy az esetükben használt lézerek/lézerrendszerek bekerülési költsége viszonylag magas és kezelésük magasszintű szakértelmet követel, továbbá a megmunkálás során a lézerfény nagy behatolási mélysége és a szükséges nagy energia miatt a munkadarab felhevített térfogatának mérete nagy és nehezen kontrollálható, ami rendszerint a munkadarab kiterjedt roncsolódását

eredményezi, így a közvetlen lézeres megmunkálási mód finom struktúrák (például mikro-, nanométeres méretű felületi elemek) kialakítására nem alkalmas.

Az indirekt eljárások közül a legjelentősebb, legtöbb lehetőséggel és előnnyel kecsegtető technikának a lézer indukált hátsó oldali nedves maratást (Laser Induced Back-Side Wet Etching: LIBWE) tartották. Eközben az átlátszó munkadarab maratni szándékozott felületét a megmunkáló lézerfény hullámhosszán erősen abszorbeáló folyadékkal hozzák közvetlen érintkezésbe, melyet a maratás során a munkadarabon keresztül a megfelelő hullámhosszú, energiájú lézerfényvel sugározzák be [182-184]. A jelenlegi elméletek szerint a lézerimpulzus energiája a folyadéknak a munkadarab megmunkálni szándékozott felületével érintkező vékony rétegében elnyelődik és eközben drasztikusan felmelegíti azt. A felmelegedés eredményeként a folyadékrétegben magas nyomású buborék keletkezik. A forró folyadékréteg ezzel párhuzamosan hőátadás útján felmelegíti és meglágyítja, adott esetben akár meg is olvasztja a munkadarab maratni szándékozott felületének vele érintkező részét. A minta marását a létrejött magasnyomású, hirtelen kitáguló buborék által a megmunkálni szándékozott felületen a munkadarab anyagára kifejtett erőhatás végzi, egyszerűen a meglágyított anyagdarab egy részének az eltávolítása/kilökése révén [185-188].

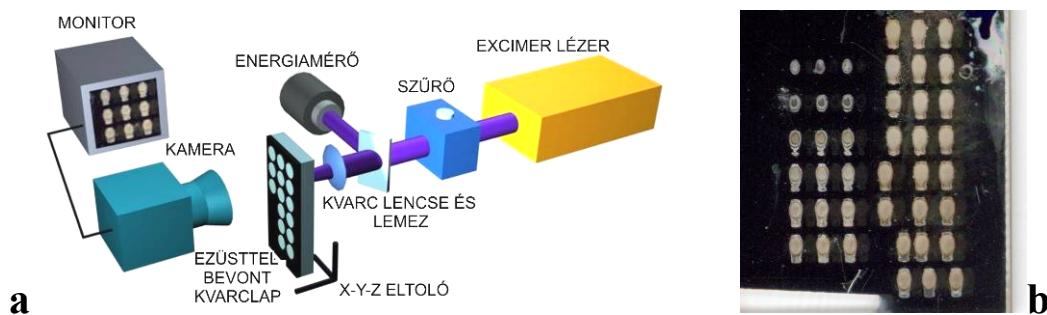
A LIBWE módszernél abszorbens folyadékként általában a környezetre és az emberi egészségre egyaránt ártalmas szerves halogénezett benzolszármazékok (például C_6H_5F , C_6H_5Cl , $C_6H_4Cl_2$) oldatait, illetve benzol, toluol, pirén/aceton, naftalin/metil-metakrilát, széntetraklorid, metanol, dimetil-szulfoxid, valamint ezekhez hasonló egyéb szerves vegyületek oldatait használják [189-192]. Ennélfogva a LIBWE módszer gyakorlati alkalmazása nagyfokú odafigyelést, az elnyelő folyadék szivárgásbiztos kezelését és megfelelő biztonsági előírások betartását követeli meg, ami a módszer ipari alkalmazását rendkívül költségessé teszi. A módszer egy további hátránya, hogy a folyékony halmazállapotú, lézerfényt elnyelő közeg alkalmazása miatt a maratás végrehajtásához speciális kiegészítő elemekre, például a folyékony abszorbens tárolására és annak a munkadarab megmunkálni szándékozott felületével való közvetlen érintkeztetésére szolgáló edényre is szükség van. Ennek előállítása külön munkafolyamatok végrehajtását teszi szükségessé, így használata általában szintén megemeli a LIBWE módszer ipari alkalmazásának költségeit.

A fentiek ismeretében az alábbi vizsgálataim célja átlátszó anyag közvetett lézeres finommegmunkálására szolgáló olyan új típusú eljárás kidolgozása, hatékonyságának vizsgálata volt, amely a LIBWE módszer bemutatott hátrányait kiküszöböli, vagy legalábbis jelentős mértékben mérsékli. Emellett célul tűzttem még ki a megmunkálás hatékonyságának (vagyis a maratás sebességének) jelentős javítását is. Összefoglalóan egy olyan, a korábbi

módszereknél hatékonyabb eljárás kifejlesztését kívántam megvalósítani, amelynél nincsen szükség környezetre és egészségre ártalmas segédanyagok kezelésére, illetve az azok használata szempontjából elengedhetetlen kiegészítő eszközökre.

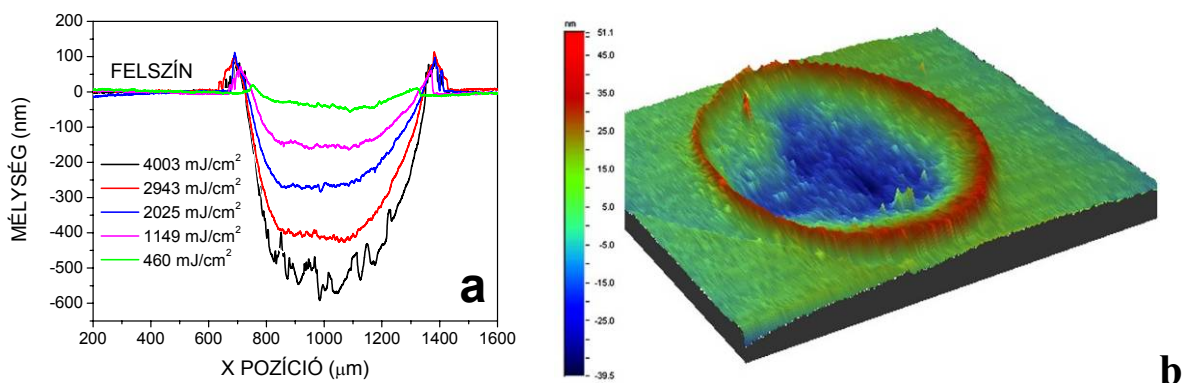
b) Átlátszó anyagok lézerindukált hátsóoldali száraz maratása (LIBDE)

A fenti céloknak megfelelően kidolgoztam a LIBWE analógiájára egy új lézeres finommegmunkálási módszert, melyben a LIBWE esetén alkalmazott, nehezen kezelhető folyékony abszorbenst szilárdal, fém vékonyréteggel helyettesítettem. Az új eljárást lézerindukált hátsóoldali száraz maratásnak, LIBDE-nek neveztem el. Az első kísérletsorozatban céltárgyként 1 mm vastag ömlesztett kvarc lemezeket alkalmaztam, melyeket 100 nm vastag ezüst réteggel vontunk be. Kimértem az ezüst abszorpciós együtthatóját az alkalmazott KrF excimer lézer (FWHM=30 ns) 248 nm-es hullámhosszán, mely $70 \mu\text{m}^{-1}$ -nek adódott. A fém filmet a kvarclapon keresztül sugároztam be az UV lézer nyalábbal, melyet egy 10 cm fókusztávolságú kvarc lencsével fókuszáltam le. A vizsgált energiasűrűség tartomány 90-4030 mJ/cm^2 volt, a foltméret pedig 1.05 mm^2 . Az energiát egy forgatható szűrővel szabályoztam, s minden egyes impulzus esetén mértem (IV.67.a ábra). Minden egyes helyre csak egyetlen lézer impulzus érkezett, mely után egy x-y eltolóval új helyre toltam a mintát. A besugárzás hatására az ezüst réteg eltűnt a megvilágított felületről (IV.67.b ábra).



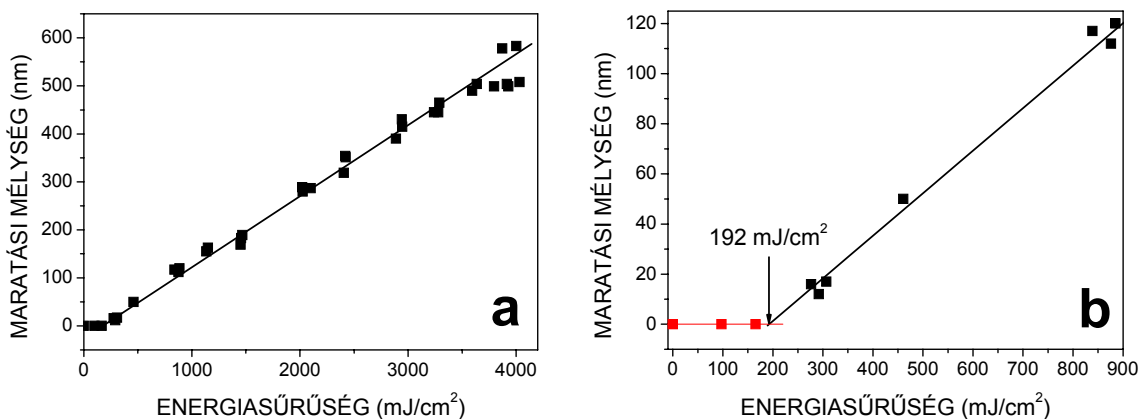
IV.67. ábra Kísérleti elrendezés átlátszó anyagok lézeres hátsóoldali száraz maratására (a) és a besugárzott ezüst filmmel fedett kvarclap fényképe (b)

A kísérlet után a kvarclapon maradt ezüstöt salétromsavval távolítottam el, s a maratási gödröket egy DEKTAK8 profilométerrel vizsgáltam. A IV.68.a ábra ezen gödrök keresztmetszetét mutatja különböző energiasűrűségű besugárzások alkalmazása esetén. Látható, hogy ezek alja viszonylag sima, s peremükön kidudorodás található. Ez utóbbi még jobban megfigyelhető a profilométerrel készített 3D-s képen, melyet a $460 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ értékkel mart gödörrel vettem fel (IV.68.b ábra).



IV.68. ábra A maratási gödrök keresztmetszete és 3D-s profilométeres képe

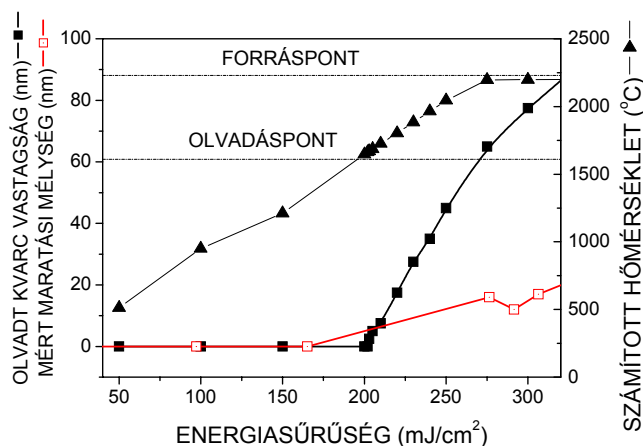
A IV.69. ábra a maximális maratási mélységet mutatja az alkalmazott energiasűrűség függvényében. Látható, hogy közöttük lineáris függés áll fenn a 270-4000 mJ/cm² energiasűrűség tartományon. A legalacsonyabb energiasűrűség, mellynél még tapasztaltam maratást 276, a legnagyobb, amelynél pedig már nem 165 mJ/cm² volt. Ez azt jelenti, hogy a maratási küszöb ezen két érték között helyezkedik el. Kinagyítva a grafikon megfelelő részét (IV.69.b ábra), s berajzolva a mérési pontokra illeszthető egyeneseket, azok metszéspontjából grafikusan pontosabban is meghatározható a maratási küszöb ömlesztett kvarc 248 nm-es lézeres hátsóoldali száraz maratására, mely 192 mJ/cm²-nek adódott [193].



IV.69. ábra A maratási mélység az energiasűrűség függvényében (a) és a maratási küszöb értékének grafikus becslése (b)

Ezen becslés megerősítésére az egydimenziós hővezetési egyenlet alkalmazásával kiszámítottam a besugárzott ezüst film és a vele érintkező kvarc réteg hőmérsékletét különböző lézer energiasűrűségekre. A számítások során figyelembe vettem a kvarc-ezüst határfelület reflexióját (36 %-nak mértem 248 nm-en), a fázisátmeneteket (olvadás, forrás), az ezüst, a kvarc és a levegő fajhőjének és hővezető képességének hőmérséklet függését.

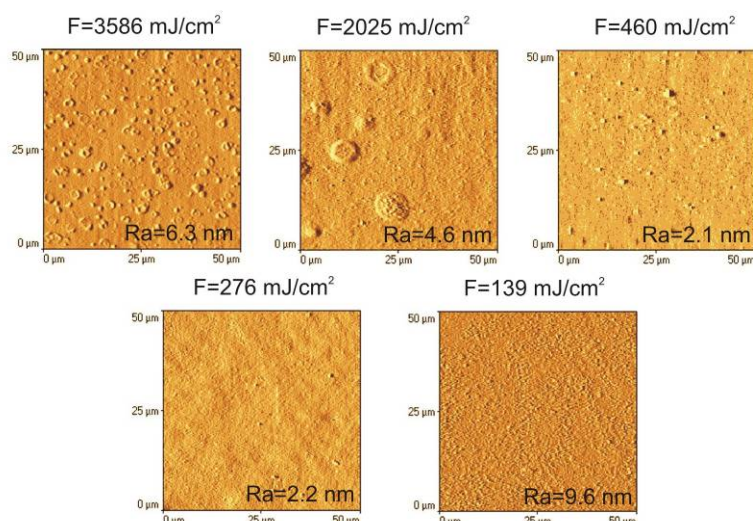
A IV.70. ábra bemutatja kvarc esetére a számított legnagyobb hőmérsékletet, a megolvadt réteg vastagságát és a mért maratási mélységet az energiasűrűség függvényében a 40-320 mJ/cm^2 tartományon. Az irodalomban nem találtam adatot a kvarc forrásáról, és a számítás nem tudja követni a folyamatokat, amint a felforró ezüst elhagyja a felszínt, ezért ez a számítás csak közelítés, de a maratási küszöb meghatározására alkalmas.



IV.70. ábra A hőmérsékletszámítások eredménye

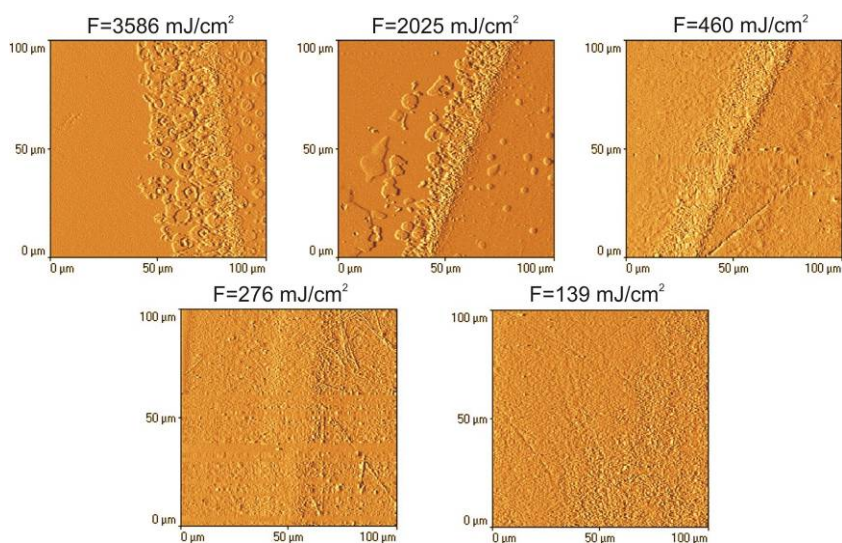
A számításokból 200 mJ/cm^2 küszöbenergiasűrűség határozható meg, ami jó egyezésben van a grafikusán becsült 192 mJ/cm^2 értékkel [194].

A maratási gödrök morfológiáját atomi erő mikroszkóppal vizsgáltam. A IV.71. ábra mutatja a gödrök alját különböző energiasűrűségek alkalmazása esetén. A készülék képanalizáló szoftverének segítségével meghatároztam a vizsgált felületek érdességére jellemző R_a érdességi paramétert. Látható, hogy a maratási felszín igen sima. A legnagyobb R_a értéket (9,6 nm) a küszöb alatti energiasűrűségnél mértem. Habár maratás ebben az esetben nem volt megfigyelhető, a besugárzott terület morfológiája mégis megváltozott. Ennek oka feltevésem szerint a kvarc kisebb mértékű felmelegedés okozta átstrukturálódása. 276 mJ/cm^2 energiasűrűség esetén egy optikai minőségű, majdnem teljesen részecskementes maratási felületet lehetett megvalósítani.



IV.71. ábra A maratási gödrök aljának atomi erő mikroszkópos képe különböző energiasűrűségek alkalmazása esetén. A képeken feltüntettem az aktuális felületekre vonatkozó Ra érdességi paraméterek értékét.

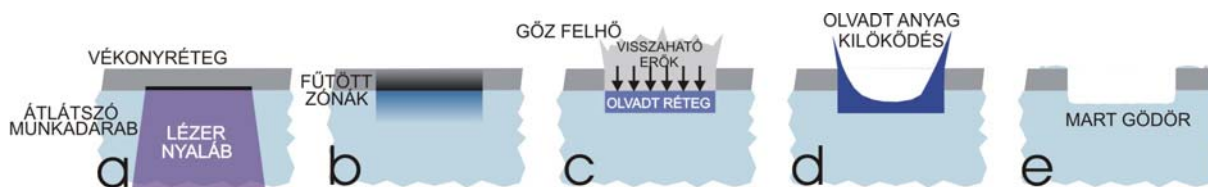
A IV.72. ábra a gödrök szélét mutatja. Ezeken is jól láthatók a keresztmetszeti grafikonon már megfigyelt kidudorodások.



IV.72. ábra A maratási gödrök szélének AFM-es képei

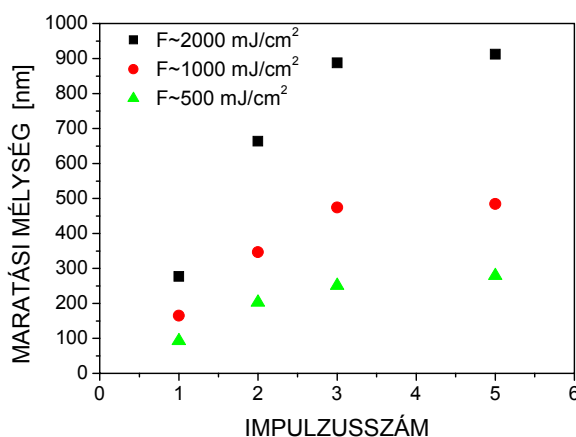
Feltevésém szerint a maratási mechanizmus a következőképpen játszódik le. A UV lézer impulzus energiája teljes mértékben elnyelődik az ezüst rétegben (IV.73.a ábra). A behatolási hossz kb. 14 nm. Az elnyelt energia drasztikusan felmelegíti a fém filmet, mely a hővezetés következtében felfűti az ömlesztett kvarc minta vele érintkező felületét (IV.73.b ábra). Elegendően nagy energiasűrűség esetén az abszorbens réteg egy az egyben elforr, mialatt az alatta levő felszíni kvarc réteg megolvad, vagy akár fel is forrhat. Az ezüst gőz felhő nagy sebességgel elhagyja a felszínt, miközben az általa gerjesztett visszaható erők erős taszító

hatással vannak a megolvadt, meglágyult kvarc térfogatra (IV.73.c ábra), melynek egy része ennek következtében kifröccsen, kilökődik a tömbi anyagból (IV.73.d ábra). A visszamaradt rész lehűl, megszilárdul (IV.73.e ábra). Ez a modell jó egyezésben van a morfológiai és mélységmérési eredményeimmel [193].



IV.73. ábra A lézerindukált hátsóoldali nedves maratás folyamata

Ezen modell szerint ez egy egy-lövéses módszer, tehát a maratandó struktúra egy lézerimpulzus hatására alakul ki. A besugárzott felületről a mart anyaggal együtt az abszorbens réteg is eltávozik, tehát elképzelésem szerint egy esetleges második impulzusnak már semmi hatása sincs a mintára. A vékonyréteg elpárolog, a mart anyag kifröccsen. Visszaépülés nincs. Ennek megerősítésére végeztem el egy többlövéses kontrol kísérletet, melynek során 120 nm-es ezüst filmmel bevont kvarclapot lőttem meg több impulzussal 500, 1000 és 2000 mJ/cm² energiasűrűségek mellett (IV.74. ábra).



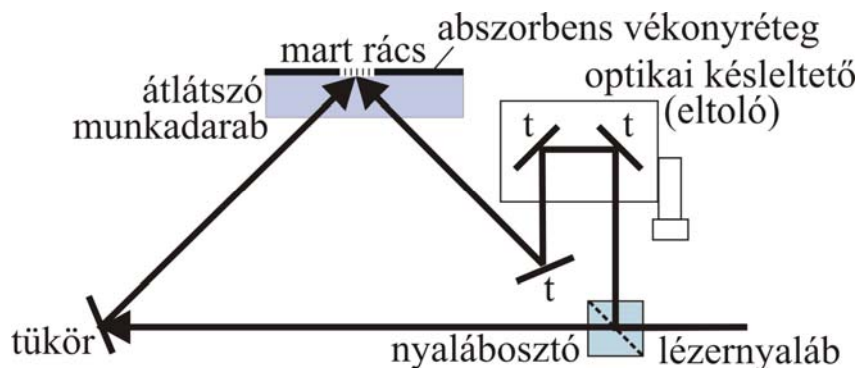
IV.74. ábra Maratási mélység az impulzusszám függvényében különböző energiasűrűségek esetén.

A kísérlet az a meglepő eredményt mutatta, hogy az abszorbens réteg eltávozása után is van még maratás. Azt tapasztaltam, hogy kb. a 3-5. impulzus esetén nem nő már tovább számottevően a maratási gödör mélysége. Ennek eredményeképpen ki kellett egészítenem a fenti modelletem az alábbiak szerint. Az abszorbens film felforrása és a kvarc megolvadása következtében a gyorsan, nagy nyomással kiterjedő fémgőz felhőből fématomok jutnak be a

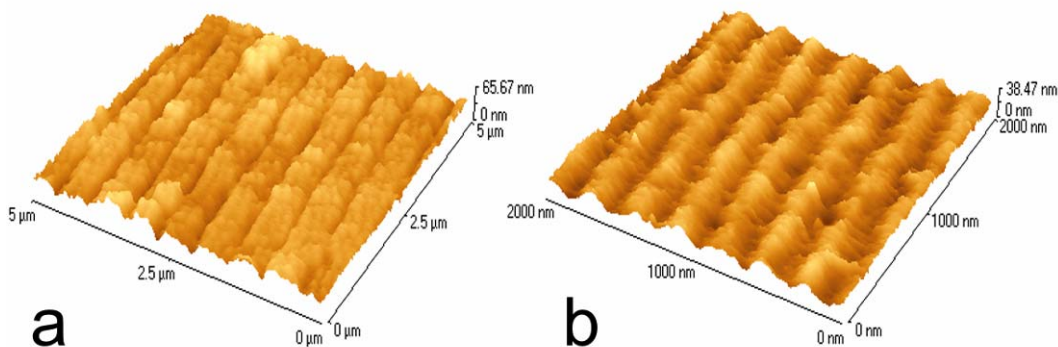
megolvadt kvarc felületi rétegébe, melynek egy része a kifröccsenés után is megmarad. Ez azt eredményezi, hogy a kvarc minta egy nagyon vékony, ~ 10 nm-es felületi rétegének abszorpciója a fématomok jelenlétének következtében jelentősen megnő, s ez tudja bizonyos mértékben helyettesíteni az eltávozott abszorbens filmet, mindaddig, míg ennek nagy része is el nem távozik a további impulzusokkal való besugárzás hatására [195].

c) Szubmikrométeres struktúra készítése LIBDE módszerrel

Annak demonstrálására, hogy a módszer alkalmas nanostruktúrák átlátszó anyagokba való maratására, végeztem el a következő kísérleteket. Ennek során egy egyszerű kétsugaras interferenciás elrendezést állítottam össze. Egy Q-kapcsolt Nd:YAG lézer (FWHM=10 ns) negyedik felharmonikusú, 266 nm-es hullámhosszú nyalábját kettéosztottam, s a két nyalábot változó beesési szögekkel (14° , illetve 30°) találkoztattam a kvarc minta ezüsttel bevont hátsó oldalán (IV.75. ábra). Azért nem a korábbi excimer lézert alkalmaztam ebben a kísérletben, mert annak koherenciahossza csak néhány 10 mikrométer, míg a most használt lézéré közel 1 cm, miközben hullámhosszuk, impulzushosszuk viszonylag közel található egymáshoz. Az alkalmazott energiasűrűség 500 mJ/cm^2 , a foltméret $0,6 \text{ mm}^2$ volt.

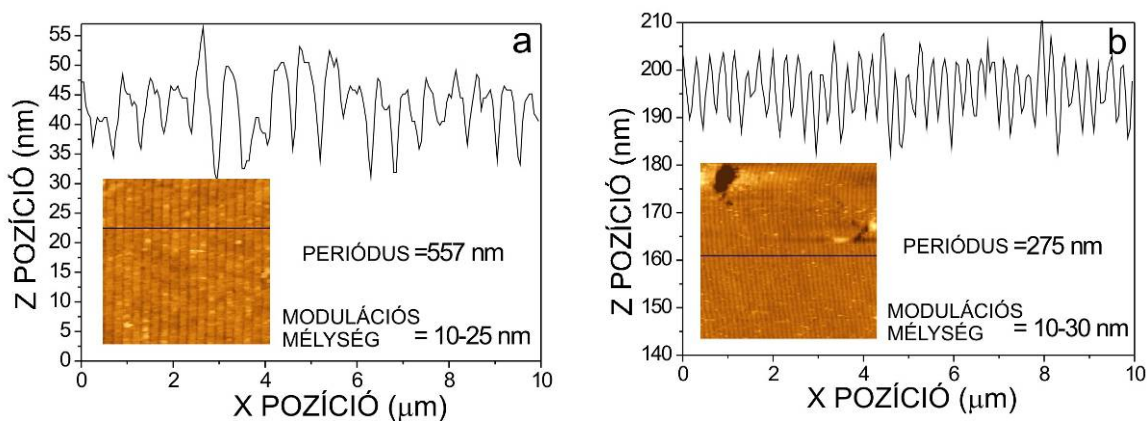


IV.75. ábra A rács maratáshoz alkalmazott kétsugaras interferenciás elrendezés



IV.76. ábra LIBDE-vel kvarclapba mátrácsok atomi erő mikroszkópos képei. Az alkalmazott beesési szögek: 14° (a) és 30° (b) voltak.

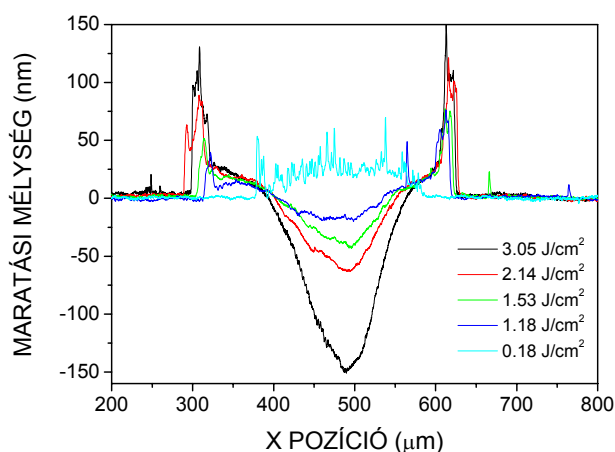
A IV.76. ábra mutatja a két rács 3-dimenziós atomi erő mikroszkópos képét, a IV.77. ábrán pedig a rácsok keresztmetszeti képe látható, melyről mind a periódus, mind pedig a modulációs mélység leolvasható. Látható, hogy a módszer alkalmas finom, szubmikrométeres struktúrák előállítására, mely tulajdonság az eljárás lehetséges alkalmazási lehetőségeinek szempontjából bírhat nagy fontossággal [194].



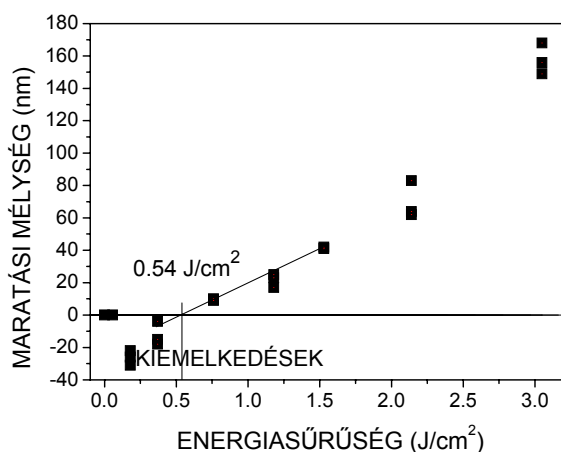
IV.77. ábra Kvarc mintába mart rácsok keresztmetszeti képei. Az alkalmazott beesési szögek: 14° (a) és 30° (b) voltak.

d) LIBDE látható fényvel

Ebben a kísérletsorozatban a megmunkáló fényforrás egy egyszerű, KrF excimer lézerrel gerjesztett Coumarin 500 festéklézer ($\lambda=500$ nm, FWHM=11 ns, max. energia 5 mJ) volt. Ennek nyalábját irányítottam rá a kvarclapra, melyet ebben az esetben 100 nm vastag alumínium abszorbens réteggel vontam be. Az alkalmazott energiasűrűséget a 0-3050 mJ/cm² tartományon változtattam. A visszamaradt alumíniumot NaOH oldattal távolítottam el a kvarc mintáról. A maratási gödröket most is profilométerrel vizsgáltam. A IV.78. ábrán látható ezek keresztmetszete különböző energiasűrűségek esetén. A grafikonon ebben az esetben is jól látható a maratási gödrök peremén korábban már megfigyelt kidudorodás. Azonban azt is tapasztaltam, hogy kb. 500 mJ/cm² alatt nem maratás következett be, nem gödör keletkezett a besugárzott felületen, hanem kiemelkedés. Ennek oka feltevésem szerint a kvarc a maratási küszöbnél kisebb lézer energiasűrűség által előidézett kisebb mértékű felmelegedés okozta átstrukturálódása, mely térfogatnövekedéssel járt. A legnagyobb energiasűrűség, melynél még nem figyeltem meg maratást, 370 mJ/cm² volt, míg a legkisebb, ahol már tudtam mélységet mérni, 760 mJ/cm² volt. A IV.79. ábra mutatja a maximális gödör mélységeket (pozitív értékek) és a kidudorodások magasságát (negatív értékek). A grafikus becslés szerint a maratási küszöb-energisűrűség kvarcra, 500 nm-es hullámhossz és alumínium abszorbens réteg alkalmazása esetén kb. 540 mJ/cm² [196].



IV.78. ábra A maratási gödrök keresztmetszeti képe különböző energiasűrűségű besugárzások alkalmazása esetén.



IV.79. ábra Maratási mélység az energiasűrűség függvényében

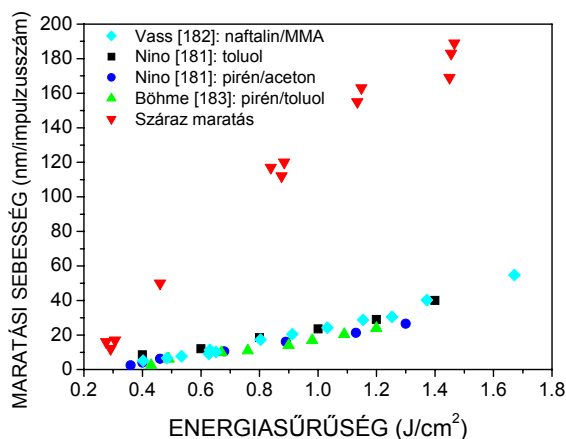
A maratási folyamatok jobb megértése érdekében $1,53 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűségű besugárzás esetén Bereznai Miklós kollégám segítségével megvizsgáltuk a maratási gödör aljának kémiai összetételét egy FESEM, Hitachi-S4700 pásztázó elektronmikroszkóppal és a hozzá csatolt EDX, Röntec-QX2 energia diszperzív röntgenspektroszkóppal. Alkalmazva a Röntec Quantax v1.6 kiértékelő programot, megállapítottuk, hogy átlagosan $0,4 \pm 0,3 \text{ at\%}$ alumínium épült be a maratási gödör aljának legfelső 1 μm vastagságú rétegébe (ennél finomabb feloldást nem tudtunk elérni). Feltehető, hogy ez a kvarcba beépülő alumínium mennyiség a felszín közelében tömörül, tehát ott alkot egy kvázi új abszorpciós réteget. Kis mennyiségű, $0,33 \pm 0,2 \text{ at\%}$ alumíniumot találtunk a peremben is, míg a besugározatlan kvarcban nem volt kimutatható fém. Mindez alátámasztja a módosított LIBDE modellel, megmagyarázza a többlövéses kísérletem esetén kapott eredményeket [196].

e) A LIBDE és a LIBWE módszerek összehasonlítása

Természetesen a hátsóoldali száraz maratás esetén nem feltétlenül kell, hogy fémből készüljön az elnyelő réteg, csak az a fontos, hogy nagy legyen az abszorpciója az alkalmazott lézer hullámhosszon. A fémek azért jók, mert rájuk majdnem a teljes fénytartományon teljesül ez a feltétel. A LIBDE azért is jobb, mint a nedves maratás (LIBWE), mert folyadékból nagyon nehéz olyat találni, készíteni, amely látható fényre is működik, míg én sikeres száraz maratást valósítottam meg zöld fényű ($\lambda=500$ nm) lézerrel is. Korlátozás az abszorbens réteg és a munkadarab anyagára, hogy maratás csak akkor valósulhat meg, ha a réteg anyagának forráspontja meghaladja a munkadarab anyagának olvadáspontját.

Nincs a megmunkálandó minta vastagságára vonatkozó korlát. Mivel átlátszó anyagokról van szó, amelyek a megmunkáló lézer hullámhosszán csak kissé nyelnek el, így nincs jelentős felső korlát. Látható fény alkalmazása esetén akár méter vastagságú kvarc hasábot is meg lehet munkálni ezzel a módszerrel. Például egy 1 mm-es kvarclap abszorbanciája 500 nm-en 0,167. Ebből az abszorpciós tényezője: kb. $4 \cdot 10^{-4}$ 1/ μm , ami 2500 mm=2.5 m behatolási mélységet jelent. S ekkor még a betáplált energia 37 %-a átmegy rajta.

Vass Csaba PhD hallgatómmal összehasonlítóképpen végeztünk maratási küszöb energiasűrűség meghatározást LIBWE-re vonatkozóan is. Vizsgálataink alapján a LIBDE eljárás küszöb-energiasűrűsége 248 nm hullámhossz, kvarc és 100 nm vastagságú ezüst abszorbens film esetén kb. $0,2 \text{ J/cm}^2$, ami 50-60-szor kisebb, mint az ablációs eljárásé ($10\text{-}12 \text{ J/cm}^2$) és kb. fele a LIBWE-s módszerének [197]. Ez azt jelenti, hogy ennek megfelelően a száraz maratással megmunkálható felület 50-60-szorosa az ablációsénak és duplája a LIBWE-snek. Ugyanazon hatás eléréséhez jóval egyszerűbb, olcsóbb elrendezés is elegendő. Jóval hatékonyabb, mint a LIBWE technika. Az alábbiakban látható egy irodalmi adatokból összeállított grafikon, amely lehetővé teszi a két eljárás maratási sebességeinek összehasonlítását kvarc esetére (IV.80. ábra).



IV.80. ábra A LIBDE és a LIBWE maratási sebességének összehasonlítása irodalmi adatok alapján

A LIBDE technika igen egyszerű „elrendezést” igényel, a LIBWE-vel ellentétben nincs szükség jól szigetelő, a munkadarabhoz erősített folyadék tartályra, folyékony abszorbensre. Ez utóbbi azért is nagy előnyt jelent, mivel ezen folyadékok nagy része erősen ártalmas az egészségre és a környezetünkre. A „rendszer” legproblémásabb eleme az abszorbens vékonyréteg, melyet pl. vákuumos párologtatással lehet felvinni a megmunkálandó felületre.

A többi módszerrel ellentétben ez egy kvázi-egylövéses eljárás, ami azt jelenti, hogy nem probléma a munkadarab esetleges finommozgása lövésről lövésre, a „zaj” nem zavarja az előállítandó szubmikrométeres struktúrát, ami a nanotechnológiai alkalmazások szempontjából fontos paraméter. Amennyiben viszont a követelmények igénylik a többimpulzusos maratást és van lehetőség egyidejű vákuumpárologtatásra, úgy elképzelhető egy olyan eljárási sor, melyben a lézeres maratás után a mart felületet ismét bevonjuk abszorbens réteggel, majd újból jön a besugárzás, párologtatás, s ezt a sort a kívánalmaknak megfelelően lehet folytatni.

Az általam kidolgozott hátsóoldali száraz maratási eljárás lehetővé teszi átlátszó anyagok lézeres finommegmunkálását, nanotechnológiai struktúrák kialakítását, mikrolencse-sorok (lézernyaláb-homogenizátorok), Fresnel-lencsék előállítását, magas roncsolási küszöbvel rendelkező, ellenálló optikai rácsok, szenzortechnikai becsatolóelemek készítését. A pillanatnyi helyzet alapján a hasonló célból kifejlesztett LIBWE technika bonyolultsága, egészség-, természetkárosító hatásai miatt nem valószínű, hogy ki tud törni a kutatólaborokból, s ipari szintű módszerré válik. A LIBDE éppen azokat a tényezőket zárja ki, melyek leginkább akadályozzák a módszer ipari alkalmazhatóságát, miközben az előnyeit továbbfejleszti [198].

Azt azonban meg kell jegyezni, hogy míg a LIBDE egy kvázi egyimpulzusos technológia, addig a LIBWE esetében korlátlan impulzus alkalmazható maratásra, ennek megfelelően az elérhető mélység ez utóbbi esetében tetszőleges lehet.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatomban bemutatott kísérletek, eredmények két fő témakör köré csoportosultak. Ezek közül az első a biológiai, biokompatibilis vékonyrétegek impulzuslézeres leválasztása volt. Az elsősorban szupravezető vékonyrétegek előállítására kifejlesztett technikát (Pulsed Laser Deposition, PLD) egyre szélesebb körben használják ma már szerves vékonyrétegek laboratóriumi előállítására is, mivel az ilyen vékonyrétegekkel szemben támasztott egyre szigorúbb követelmények (a folyamatok jobb kontrollálhatósága, speciális mintázatok készítése, több anyagból álló vékonyréteg mátrixok létrehozása, mikrométeres feloldás, stb.) egyre vonzóbbá teszik a lézereken alapuló technikákat a hagyományos eljárásokkal szemben. A biológiai, illetve biokompatibilis vékonyrétegek impulzus lézeres leválasztása során az adott célanyaghoz optimalizáltam a kísérleti paramétereket, igazoltam a biológiai funkciók megőrződését, kidolgoztam egy, a sérülékeny szerves minták impulzus lézeres leválasztására alkalmazható új modellt, vizsgáltam a leválasztott rétegek alkalmazási lehetőségeit.

1. Kísérleteim során először tettem javaslatot PLD-vel előállított Teflon védőbevonat alkalmazására allergén tárgyak elszigetelése céljából. Az eljárással, az általam meghatározott optimális kísérleti paraméterek mellett kompakt, összefüggő, hajszálrepedésektől mentes, a szubsztráthoz jól tapadó, néhány mikrométer vastagságú Teflon vékonyrétegeket választottam le allergén tárgyak (pl. 14 karátos arany, ékszerezüst) felületére. A tapadási és a kémiai szigetelőképeségi kísérleteim bizonyították, hogy ezen vékonyrétegek alkalmasak lehetnek az emberi szövet és az allergén fémek egymástól való elszigetelésére és ezáltal az allergiás reakciók elkerülésére. [1-8]
2. Elsőként készítettem sztöchiometrikus vékonyréteget egy biopolimerből, a polihidroxibutirátból impulzus lézeres vékonyréteg leválasztási eljárással. Megállapítottam az ehhez szükséges optimális energiasűrűség tartományt. Ellipszometriás mérések alapján meghatároztam ezen anyag törésmutatójának és abszorpciós együtthatójának hullámhossz függését, melyre ezidáig irodalmi adat nem volt található. [9]
3. Kísérleteim során elsőként mutattam ki, hogy megfelelő leválasztási paraméterek alkalmazásával pepszin céltárgyból impulzuslézeres vékonyréteg építési technikával

biológiailag aktív pepszin vékonyrétegek készíthetők. A $0,38\text{--}5,1\text{ J/cm}^2$ közötti energiasűrűség tartományon növesztett rétegek kémiai összetétele hasonló a kiinduló anyagéhoz. Azonban az emésztési teszt kimutatta, hogy a kémiai hasonlóság nem feltétlenül jelenti az enzimatikus képesség megőrzését. A katalitikus képességüket a $0,38$ és $1,22\text{ J/cm}^2$ energiasűrűséggel készített vékonyrétegeink megőrizték, viszont $2,4\text{ J/cm}^2$ -nél (és feltételezhetően ennél magasabb értékeknél) már elveszítették. [10-12]

4. Bebizonyítottam, hogy mind MAPLE, mind pedig PLD technikákkal lehetséges szöchiometrikus ureáz vékonyréteget leválasztani. Megvizsgáltam a rétegleválasztás sebességét a MAPLE oldat koncentrációjának függvényében. Kimutattam, hogy az 5%-os oldatból lehet adott impulzusszám mellett a legvastagabb filmet létrehozni. PLD esetén a leválasztás gyorsabbnak adódott, sebessége a MAPLE-lel elérhetőnek mintegy háromszorosa. Új modellt dolgoztam ki a MAPLE-lel történő leválasztás folyamatára, mivel az irodalomban fellelhető leírások nem bizonyultak kielégítőnek. Bebizonyítottam, hogy megfelelő feltételek esetén a leválasztott rétegek megőrizték biológiai aktivitásukat. [13-15]
5. Elsőként demonstráltam, hogy impulzulézeres vékonyréteg leválasztással az eredeti fog anyagéhoz hasonló kémiai összetételű, de csökkentett OH^- és CO_3^{2-} tartalmú vékonyrétegeket lehet előállítani. A karbonát tartalom növelhető utólagos, normál atmoszférán történő hőkezeléssel. Az elkészített vékonyrétegek azt mutatták, hogy a porból készített, nem hőkezelt céltárgyak préselésénél alkalmazott nyomás nagymértékben befolyásolja a réteg növekedési sebességét és a felületének érdességét. Az utólagos hőkezelés nagymértékben javítja a rétegek mechanikai hatásokkal szembeni ellenállását. [16,17]
6. Egy szubpikuszekundumos KrF excimer lézert alkalmazva bebizonyítottam, hogy a femtoszekundumos PLD is alkalmas szöchiometrikus vékonyrétegek leválasztására a fenti sérülékeny biológiai, illetve biokompatibilis anyagokból. [18]
7. Elsőként sikerült PLD-vel sejtmegtapadást elősegítő anyagokból olyan strukturált vékonyrétegeket kialakítanom, melyek lehetővé tették különböző sejtkultúrákból élő

sejtek irányított megtapadását, szaporodását, belőlük adott sejtmátrix, mintázat készítését. [19]

A másik kutatási témám az általam, más kutatócsoportokkal egyidejűleg, de tőlük függetlenül kifejlesztett eljárásnak, a biológiai minták abszorbeáló réteggel elősegített előreirányuló lézeres átvitelének (Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer, AFA-LIFT) a vizsgálata volt. Ennek során egy nagy abszorpciójú vékonyréteggel bevont átlátszó hordozóra (donor) felvitt sérülékeny biológiai anyag a hordozón keresztül történő lézeres besugárzással átvihető a vele szemben, tőle kis távolságra elhelyezett szubsztrátra (akceptor). Ez a módszer lehetővé teheti érzékeny biológiai anyagokból és organizmusokból álló mátrixok, háromdimenziós struktúrák előállítását is.

8. Elsőként igazoltam, hogy az abszorbeáló réteggel elősegített előreirányuló lézeres átviteli eljárás alkalmas *Trichoderma* spórákból álló mintázatok létrehozására. Demonstráltam, hogy a folyamat során az átvitt spórák megőrizték csírákéességüket. Az alkalmazott ezüst vékonyréteg hatékony átvivő anyagnak bizonyult, a csírázási arány meghaladta a 75 %-ot optimális energiasűrűség alkalmazásánál. [20,21]
9. Elsőként bizonyítottam be, hogy megfelelő paraméterek alkalmazása esetén az AFA-LIFT módszer alkalmas sérülékeny, frissen izolált sejtek kontrollált átvitelére, melynek során megőrzik osztódó-képességüket és fenotípusukat. Ennek megfelelően az eljárás alkalmasnak bizonyulhat a jövőben szövetépítésre, sérült szövetek javítására. A távlati céljainknak (szaruhártya építés) megfelelően elsőként határoztam meg az emberi szaruhártyát alkotó különböző szövettípusok abszorpciós együtthatóját az UV hullámhossz tartományon. [22-26]
10. Az időfelbontásos fényképezéssel történő vizsgálataim elsőként mutatták ki, hogy az átvitel során a biológiai minták nagy mechanikai erőhatásoknak vannak kitéve. A *Trichoderma* spórákkal végzett kísérletek azt bizonyították, hogy a kezdeti gyorsulási szakaszban a spórák átlagos gyorsulása nagyobb, mint $10^9 \times g$. Az alkalmazott kísérleti körülmények között az elpárolgó ezüst ~ 1150 m/s sebességre gyorsította a spórákat. A sejtek esetén ezek az értékek $10^7 \times g$ és ~ 100 m/s voltak [27-29].

11. Az AFA-LIFT kísérletek során felfedeztem az átlátszó anyagok lézeres hátsóoldali száraz maratódásának jelenségét, melyből kifejlesztettem a LIBDE eljárást, melynek hazai és nemzetközi szabadalmaztatása jelenleg folyamatban van. Meghatároztam a módszer fő jellemzőit, kidolgoztam egy modellt a leírására, bebizonyítottam, hogy alkalmas nanostruktúrák kialakítására, s hogy működik látható fényű lézerekkel is. Kimutattam, hogy a módszer egy impulzust tekintve sokkal hatékonyabb, mint a többi indirekt lézeres maratási eljárás. [30-35]

Az értekezés alapját képző tudományos közleményeim

1. T. Smausz, N. Kresz, B. Hopp: "Target morphology dependence of the particulate generation during excimer laser ablation of polytetrafluoroethylene", Appl. Surf. Sci. Vol 177/1-2, 66-72 (2001)
2. T. Smausz, B. Hopp, N. Kresz: „Pulsed laser deposition of compact high adhesion PTFE thin films”, J. Phys. D: Appl. Phys. 35 No. 15, 1859-1863 (2002)
3. B. Hopp, N. Kresz, J. Kokavecz, T. Smausz, H. Schieferdecker, A. Döring, O. Marti, Z. Bor: „Adhesive and morphological characteristics of surface chemically modified polytetrafluoroethylene films”, Appl. Surf. Sci. 221 (1-4): 437-443 JAN 15 2004
4. B. Hopp, T. Smausz, P.M. Nagy, A. Juhász, F. Ignác, Z. Márton: „Production of biologically inert Teflon thin layers on the surface of allergenic metal objects by pulsed laser deposition technology” Appl. Phys. A 76, 731-735 (2003)
5. T. Smausz, B. Hopp, N. Kresz, Cs. Vass: „The influence of particulate size on the formation of compact polytetrafluoroethylene thin films during pulsed laser deposition” 3rd GR-I International Conference on New Laser Technologies and Applications, Szeptember 4-9. 2002., Patasz, Görögország, Proceedings of SPIE Vol. 5131, 274-278 (2003)
6. N. Kresz, J. Kokavecz, T. Smausz, B. Hopp, M. Csete, S. Hild and O. Marti: „Investigation of pulsed laser deposited crystalline PTFE thin layer with pulsed force mode AFM”, Thin Solid Films, Volumes 453-454, Pages 239-244 April (2004)
7. N. Kresz, T. Smausz and B. Hopp: „Growth modeling of pulsed laser deposited Teflon thin layers based on the size distribution of the constituting particulates”, Appl. Surf. Sci. 253, 8160-8164 (2007)
8. R. Smajda, Á. Kukovecz, B. Hopp, M. Moh, Z. Kónya, I. Kiricsi: „Morphology and N₂ permeability of multi-wall carbon nanotube– Teflon membranes” J. Nanosci. Nanotech. 7 (4-5): 1604-1610 APR-MAY (2007)
9. G. Kecskeméti, T. Smausz, N. Kresz, Zs. Tóth, B. Hopp, D. Chrisey and O. Berkesi: “Pulsed laser deposition of polyhydroxybutyrate biodegradable polymer thin films using ArF excimer laser”, Appl. Surf. Sci., 253, 1185–1189 (2006)
10. G. Kecskeméti, N. Kresz, T. Smausz, B. Hopp, A. Nógrádi: „Pulsed laser deposition of pepsin thin films” Appl. Surf. Sci. 247 83–88 (2005)
11. Hopp Béla, Smausz K. Tamás, Csete Mária, Tóth Zsolt, Kresz Norbert, Kecskeméti Gabriella, Bor Zsolt: Lézerek speciális orvosi és biológiai alkalmazási lehetőségei" Magyar Tudomány, 2005. 12. old. 1525
12. T. Smausz, B. Hopp, N. Kresz, G. Kecskeméti, Zs. Bor: PULSED LASER DEPOSITION OF BIOLOGICAL AND BIOCOMPATIBLE THIN LAYERS, The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference, EMBEC'05 Prague, Czech Republic November 20 – 25, 2005, IFMBE Proc. 2005 11(1) ISSN: 1727-1983

© 2005 IFMBE

13. E. György, F. Sima, I. N. Mihailescu, T. Smausz, B. Hopp, D. Predoi, S. Ciuca, L. E. Zdrentu, S. Petrescu: „Biomolecular urease thin films grown by laser techniques for blood diagnostic applications”, közlésre elfogadva az Appl. Surf. Sci.-be
14. T. Smausz, G. Megyeri, R. Kékesi, Cs. Vass, B. Hopp, E. György, I.N. Mihailescu: „Deposition of active urease thin films by laser-based deposition methods”, Conference on Laser Ablation (COLA07), Teneriffe, Spanyolország, 2007
15. E. György, F. Sima, I. N. Mihailescu, T. Smausz, G. Megyeri, R. Kékesi, B. Hopp, L. Zdrentu, S. M. Petrescu: “Immobilization of urease by laser techniques: synthesis and application to urea biosensors” közlésre elfogadva a Journal of Biomedical Materials Research-be
16. Smausz Tomi, Hopp Béla, Huszár Helga, Kecskeméti Gabriella, Pelsöczy K. István, Turzó Kinga: „Fog-vékonyréteg előállítás impulzus lézeres vékonyrétegépítéssel”, Kvantumelektronika 2003, Budapest, Október 21.
17. T. Smausz, B. Hopp, H. Huszár, Z. Tóth, G. Kecskeméti: “Pulsed laser deposition of bioceramic thin films from human tooth”, Appl. Phys. A 79, 1101-1103 (2004)
18. B. Hopp, T. Smausz, G. Kecskeméti, A. Klini and Zs. Bor: “Femtosecond pulsed laser deposition of biological and biocompatible thin layers”, Appl. Surf. Sci. 253, 7806-7809 (2007)
19. A. Nógrádi, B. Hopp, T. Smausz, Zs. Bor, L. Kolozsvári, A. Szabó, G. Kecskeméti, A. Klini: „Directed cell growth on laser-transferred 2D biomaterial matrices” közlésre elfogadva a Tissue Engineering-be
20. B. Hopp, T. Smausz, Zs. Antal, N. Kresz, Zs. Bor, D. Chrisey: „Absorbing film assisted laser induced forward transfer of fungi (Trichoderma conidia)”, J. Appl. Phys. 96: Number 6, 3478-3481 (2004)
21. Antal Zs., Hopp B., Smausz T., Kresz N., Bor Zs., D. Chrisey.: „Egy Trichoderma törzs konídiumainak irányított, lézeres, térbeli mozgása”, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése, Keszthely, Előadás kivonatok 1-2. (2004)
22. Hopp Béla, Smausz Tamás, Kresz Norbert, Barna Norbert, Bor Zsolt, Kolozsvári Lajos, Douglas B. Chrisey, Szabó András, Nógrádi Antal: „Különböző élő sejtek túlélési és proliferációs képességei lézeres sejtmásolás után / Survival and proliferation ability of different types of living cell after laser-induced forward transfer”; A Magyar Szemorvostársaság 2005. évi Kongresszusa Annual Congress of the Hungarian Ophthalmological Society 2005
23. B. Hopp, T. Smausz, N. Kresz, N. Barna, Zs. Bor, L. Kolozsvári, D.B. Chrisey, A. Szabó and A. Nógrádi: „Survival and proliferation ability of various living cell types after laser-induced forward transfer”, Tissue Engineering vol. 11, November 11/12 1817-1823 (2005)
24. A. Doraiswamy, R.J. Narayan, T. Lippert, L. Urech, A. Wokaun, M. Nagel, B. Hopp, M. Dinescu, R. Modi, R.C.Y. Auyeung and D.B. Chrisey Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer Appl. Surf. Sci., 252, 4743-4747 (2006)
25. T. Smausz, B. Hopp, A. Nógrádi, L. Kolozsvári, N. Kresz, Zs. Bor: „LASER-BASED MICROPATTERN PRODUCTION FROM LIVING CELLS”, The World Academy of BioMedical Technologies – WABT Conference, WABT-BIOMINT 2006, Budapest, Hungary
26. L. Kolozsvári, A. Nógrádi, B. Hopp, Z. Bor: „UV absorbance of the human cornea in the 240-to 400-nm range”, Invest. Ophth. Vis. Sci. 43 (7): 2165-2168 JUL (2002)
27. B. Hopp, T. Smausz, N. Barna, Cs. Vass, Zs. Antal, L. Kredics and D. Chrisey: „Time-resolved study of absorbing film assisted laser induced forward transfer of

- Trichoderma longibrachiatum conidia” J. Phys. D: Appl. Phys. 38 833-837 (2005)
28. B. Hopp, T. Smausz, N. Kresz, Zs. Antal, Cs. Vass, Zs. Bor, L. Kolozsvári, D.B. Chrisey and A. Nógrádi: „LASER BIO-PRINTING OF CONIDIA AND LIVING CELLS USING ABSORBING FILM ASSISTED LASER INDUCED FORWARD TRANSFER”, The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference, EMBEC'05 Prague, Czech Republic November 20 – 25, 2005, IFMBE Proc. 2005 11(1) ISSN: 1727-1983 © 2005 IFMBE
 29. T. Smausz, B. Hopp, G. Kecskeméti, Zs. Bor: „Study on metal microdroplet content of the material transferred with absorbing film assisted laser induced forward transfer method when using silver absorbing layer”, Appl. Surf. Sci. 252, 4738-4742 (2006)
 30. B. Hopp, Cs. Vass and T. Smausz: “Laser induced backside dry etching of transparent materials”, Appl. Surf. Sci., 253, 7922-7925 (2007)
 31. B. Hopp, Cs. Vass, T. Smausz and Zs. Bor: “Production of submicrometer fused silica gratings using laser induced backside dry etching technique”, J. Phys. D: Appl. Phys. 39, 4843–4847 (2006)
 32. B. Hopp, T. Smausz, M. Bereznai: „Processing of transparent materials using visible nanosecond laser pulses” Appl. Phys. A 87, 77–79 (2007)
 33. T. Csizmadia, T. Smausz, N. Kresz and B. Hopp: „Dependence of the laser induced backside dry etching parameters on the applied absorber material” közlésre elfogadva az Appl. Surf. Sci.-be
 34. ELJÁRÁS ÁTLÁTSZÓ ANYAG KÖZVETETT IMPULZUSLÉZERES MEGMUNKÁLÁSÁRA, P0600443 a.sz. magyar, USA és Japán szabadalmi bejelentés
 35. Cs. Vass, D. Sebők, B. Hopp: „Comparing study of sub-picosecond and nanosecond wet etching of fused silica”, Applied Surface Science, Volume 252, Issue 13, 30 April, Pages 4768-4772 (2006)

Az eredmények lehetséges hasznosítása

A Teflon vékonyréteg leválasztási kísérleteim célja egy olyan védőbevonat előállítása volt, mely elszigetelheti az emberi testet az allergén reakciót kiváltó tárgyaktól. Eredményeim bizonyították, hogy az általam, megfelelő paraméterek esetén készített Teflon vékonyrétegek megfelelnek a kitűzött célnak, alkalmasak lehetnek az emberi szervezet és az allergén fémeket tartalmazó tárgyak egymástól való elszigetelésére és ezáltal az allergiás reakciók elkerülésére. A vizsgálatok során az is kiderült, hogy szivacsos szerkezetű Teflon vékonyréteg pedig alkalmazható lehet olyan esetekben, amikor olyan rétegre van szükség, mely elektromosan szigetelő, viszont lehetővé teszi a réteg két oldala közötti gázátáramlást. Ez többféle gáz detektálására alkalmas szenzor szendvics esetén lehet fontos tulajdonság, melyben az érzékelő rétegeket elektromosan el kell választani egymástól, miközben a gázáramlást biztosítani kell közöttük.

A polihidroxibutirát biopolimer vékonyréteg lehetséges alkalmazási területei az elbomló vékony csomagolóanyagok, adott idő után felszívódó bevonatok, sebkötöző fóliák gyártása, felhasználása. Felmerült, hogy talán beszakadt dobhártyák időlegesen pótolhatók lehetnének PHB vékonyrétegekkel. A dobhártya rugalmas szövet, ezért a pótlására kifejlesztett anyagnak is megfelelő rugalmassággal kell rendelkeznie. A PHB réteg, porózus szerkezetének köszönhetően „nem teljesen” zárja le a sebet, így a dobhártya műtétek után felgyülemelő folyadékot átengedné, így könnyebben kitisztulhatna a belsőfül. A beszakadt dobhártya, helyreállító műtét nélkül is visszanő egy idő után, viszont a ráhelyezett vékonyréteg biztosabb felületet és helyes irányt biztosítana a visszanőni kívánó szövetnek. A leválasztott polimer réteg biológiai lebonthatósága miatt a szervezetben azalatt az idő alatt, míg a dobhártya visszanőne, le is bomlana. Így, szinte egyidőben az új szövet kialakulásával a PHB réteg is eltűnik.

A leválasztott ureáz vékonyrétegeket a bioszenzor technikában lehetne alkalmazni olyan reakciók detektálására, melyekben ammónia játszik valamilyen szerepet.

A tapasztalatok szerint a fogimplantátumok az esetek bizonyos százalékában kilökődnek a szervezetből, vagyis a csontintegráció nem jön létre. Ennek oka az, hogy a beültetett implantátumok anyaga nem lép megfelelő kapcsolatba a csontszövettel. Az összeintegrációt a felület morfológiája és kémiai szerkezete egyaránt befolyásolja. Az implantátum felületének valamilyen szervezetbarát anyaggal való bevonása elősegítheti a megfelelő kapcsolat kialakulását, az implantátum beépülését a szervezetbe. Mi lenne szervezetbarátabb anyag, mint maga a paciens foga? Eredményeim azt mutatták, hogy PLD módszerrel van lehetőség az implantátum saját foganyaggal való bevonására, amely megoldhatja a jövőben a beültetési problémákat. A módszer esetleg még kiterjeszthető lenne egyéb implantátumok beépülésének elősegítésére is.

A biológiai anyagokból és élő sejtekből álló heterogén mátrixok és rétegek kialakítása elengedhetetlen feltétele a szövetépítésre alkalmas háromdimenziós struktúrák, szövet alapú érzékelő eszközök, valamint alap- és alkalmazott kutatási célokat szolgáló rendezett mikroorganizmus kultúrák előállításának. A felsorolt alkalmazási lehetőségek közül talán a szövetépítés tűnik a leginkább figyelemre méltónak. A szövettervezés és építés a különböző betegségek és sérülések kezelését célzó új technikák egy speciális, jelentős fejlődést mutató csoportja. A felhasznált biológiai elemek és élő sejtek az építendő, vagy javítandó szövetek,

szövetrészek típusa szerint különbözőek lehetnek. Amennyiben különböző sejttípusok tenyészeit írógép-szalaghoz hasonlóan lehetne felhasználni teljes szövetek rétegenkénti felépítéséhez, óriási lehetőségek nyílnának az orvostudomány számára. Erre egy igen ígéretes módszer ebben a pillanatban az AFA-LIFT, illetve a Lézer BioPrinting technika, mely az eredmények szerint alkalmas különböző típusú élő sejtek kontrollált átvitelére, adott sejtstruktúrák kialakítására.

Az általam kidolgozott hátsóoldali száraz maratási eljárás lehetővé teszi átlátszó anyagok lézeres finommegmunkálását, nanotechnológiai struktúrák kialakítását, makrooptikai elemek, mikrolencse-sorok (lézernyaláb-homogenizátorok), Fresnel-lencsék, mikrocsatornák előállítását, magas roncsolási küszöbvel rendelkező, ellenálló optikai rácsok, szenzortechnikai becsatolóelemek készítését.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Bor Zsolt akadémikusnak: elsőként a kutatási témáért, amit nekem javasolt, mikor a vezetése alatt álló Lézerfizikai Tanszéki Kutatócsoportba kerültem, melyre visszagondolva, azóta is biztos vagyok benne, hogy nem is adhatott volna jobbat, amely ennyire megfelelt volna elsősorban kísérletező, problémamegoldó hajlamaimnak. Másodszor köszönetet mondok figyelméért, rendületlen ösztökéléseért, buzdításáért, támogatásáért. Utoljára, de nem utolsó sorban pedig rengeteg ötletéért, melyek, ha nem is mindig voltak egyszerűen megvalósíthatók, de nagyon sok tudományos érdekességet tartalmaztak, s sokat tanultam belőlük.

Köszönetet mondok Dr. Szörényi Tamásnak, második mentoromnak, aki számtalan akadályon segített átkelni, s akitől nemcsak szakmailag, de emberileg is sokat tanultam. Ez a dolgozat nem jöhetett volna létre az ő közreműködése, támogatása nélkül.

Köszönöm Dr. Rácz Béla professzor és Dr. Szabó Gábor akadémikus sok segítségét, melyek révén számomra megoldhatatlannak tűnő problémák is megoldhatóvá váltak. Pályafutásom alatt egyetlen olyan esetre sem emlékszem, mikor hiába kértem volna tőlük tanácsot, segítséget.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Dr. Smausz Tominak, Kresz Norbertnek, Vass Csabának és Kecskeméti Gabriellának a sok munkát, melyet vezetésem alatt már hallgató koruktól kezdve végeznek, mellyel lehetővé tették, hogy kutatási ötleteim a gyakorlatban is megvalósulhassanak. Külön köszönöm barátságukat, azt a nagyszerű légkört, amelyben már évek óta együtt dolgozunk.

Hálával tartozom az SZTE Szemészeti Klinika dolgozóinak a munkám során felmerülő biológiai, orvosi problémák megoldásában nyújtott segítségükért. Köszönöm Dr. Szabó Andrásnak a sejtteni eredmények feldolgozásában nyújtott közreműködését, Kovács Attiláné és Katona Ferencné laborasszisztenseknek a szükséges biológiai minták biztosítását. Külön köszönöm Dr. Nógrádi Antal egyetemi docensnek felbecsülhetetlen mennyiségű segítségét, határtalan segítőkészségét, türelmét, mellyel hozzáállt az általam, laikusként felvetett biológiai problémákhoz. Köszönöm még Dr. Kolozsvári Lajos professzor úrnak, a klinika igazgatójának, hogy támogatásával mindezt lehetővé tette.

Köszönettel tartozom még azon kollégáknak, kik kutatómunkámban közreműködtek a fentiek felül, Dr. Antal Zsuzsannának, Dr. Márton Zsuzsannának, Dr. Nagy Piroskának, Dr. Tóth Zsoltnak, Dr. Berkesi Ottónak, Bereznai Miklósnak, a külföldi kollégáknak, Dr. Douglas B. Chrisey-nek, Dr. György Enikőnek, Dr. Ion Mihailescu-nak, Dr. Arula Klini-nek és Dr. Costas Fotakis-nak.

Köszönetet mondanék a tanszék minden dolgozójának, legyen oktató, kutató, irodai dolgozó vagy szakmunkás segítségükért, s azért a jó hangulatért, jó közösségért, amely lehetővé tette munkám elvégzését, dolgozatom megírását.

HIVATKOZÁSOK

1. R. Srinivasan, V. Mayne-Banton: Appl. Phys. Lett. 41, 576 (1982)
2. G. D. Mahan, H. S. Cole, Y. S. Liu, H. R. Philipp: Appl. Phys. Lett. 53, 2377 (1988)
3. P. E. Dyer, D. M. Karnakis, P. H. Key and J. P. Tait: Appl. Surf. Sci., 96-98, 596 (1996)
4. J. Meyer, J. Kutzner, D. Feldmann, K.H. Welge: Appl. Phys. B45, 7 (1988)
5. G. Pettit, R. Sauerbrey: Appl. Phys. Lett. 58, 793 (1991)
6. G. Gorodetsky, T. G. Kazyaka, R. L. Melcher, R. Srinivasan: Appl. Phys. Lett. 46, 828 (1985)
7. R. Srinivasan, B. Braren, R. W. Dreyfus: J. Appl. Phys. 61, 372 (1987)
8. R. Srinivasan: Appl. Phys. A 56, 417 (1993)
9. S. R. Cain, F. C. Burns, C. E. Otis, B. Braren: J. Appl. Phys. 72, 5172 (1992)
10. P. Klopotek, B. Burghardt, W. Mückenheim: J. Phys. E 20, 1269 (1987)
11. R. Srinivasan, K. G. Casey, B. Braren: Chemotronics 4, (1989)
12. R. Srinivasan, K. G. Casey, B. Braren, M. Yeh: J. Appl. Phys. 67, 1604 (1990)
13. R. Srinivasan, K. G. Casey, B. Braren: Pure Appl. Chem. 62, 1581 (1990)
14. S. Küper, M. Stuke: Appl. Phys. A49, 211 (1989).
15. S. Küper, M. Stuke: Appl. Phys. B44, 199 (1987).
16. R. Srinivasan, B. Braren, K.G. Casey: J Appl. Phys. 68, 1842 (1990).
17. T. Lippert, R.L. Webb, S.C. Langford, J.T. Dickinson: J. Appl. Phys. 85, 1838 (1999).
18. B. Hopp, J. Kokavecz, T. Smausz, N. Kresz, S. Hild, O. Marti, Z. Bor: J. Appl. Phys. 96, 5548 (2004)
19. D.B. Geohegan: Thin Solid Films 220, 138 (1992)
20. B. Hopp, M. Csete, G. Szabó, Zs. Bor: Appl. Phys. A 61, 339 (1995)
21. T. Smausz, N. Kresz, B. Hopp: Appl. Surf. Sci. 177/1-2, 66 (2001)
22. [Douglas B. Chrisey](#) (Editor), [Graham K. Hubler](#) (Editor): *Pulsed Laser Deposition of Thin Films*, Wiley, New York, 1994 ISBN: 978-0-471-59218-1
23. Y. B. Zel'dovich, Y. P. Raizer: *Physics of shock waves and high-temperature hydrodynamic phenomena*, Academic Press New York and London, 94 (1966)
24. H. Guo, Q. Lou, S. C. Chen, N. H. Cheung, Z. Y. Wang and P. K. Lin: Opt. Com. 98, 220 (1993)

-
25. O. Yavas, E. L. Maddocks, M. R. Papantonakis and R. F. Haglund: Appl. Surf. Sci. 127-129, 26 (1998)
 26. Zs. Bor, B. Hopp, B. Rácz, G. Szabó, I. Ratkay, I. Süveges, Á. Füst, J. Mohay: Ref. & Corneal Surg. 9, 111 (1993)
 27. P. Simon: Appl. Phys. B 48, 253 (1989)
 28. X. Mao, W.T. Chan, M. Caetano, M.A. Shannon and R.E. Russo: Appl. Surf. Sci. 96-98, 126 (1996)
 29. A. Di Trollo, A. Morone, S. Orlando and A. Paladini: Appl. Surf. Sci. 168, 136 (2000)
 30. R. Srinivasan, B. Braren, D. E. Seeger, R. W. Dreyfus: Macromolecules 19, 916 (1986)
 31. D. L. Singleton, G. Paraskevopoulos, G. S. Jolly, R. S. Irwin, D. J. McKenney, W. S. Nip, E. M. Farrel, L. A. Higginson: Appl. Phys. Lett. 48, 878 (1986)
 32. J. F. Ready: Appl. Phys. Lett. 3, 11 (1963)
 33. R. M. White: J. Appl. Phys. 34, 3559 (1963)
 34. G. A. Askar'yan, A. M. Pokhorov, G. F. Chantutiya, G. P. Shipulo: Sov. Phys. JETP 17, 6 (1963)
 35. F. Breech, L. Cross: Appl. Spect. 16, 59 (1962)
 36. H. M. Smith, A. F. Turner: Appl. Opt. 4, 147 (1965)
 37. S. V. Gaponov, A. A. Gudkov, V. I. Luskin, I. Salaschenko: Sov. Tech. Phys. Lett. 5, 210 (1979)
 38. H. Oesterreicher, H. H. Bittner, B. Kothari: J. Solid State Chem. 26, 97 (1978)
 39. D. Dijkkamp, T. Venkatesan, X. D. Wu, S. A. Shaheen, N. Jisrawi, Y. H. Min-Lee, W. L. McLean, M. Croft: Appl. Phys. Lett. 51, 619 (1987)
 40. J. T. Cheung, J. Madden: J. Vac. Sci. Tech A1(3), 1604 (1987)
 41. F. Beech, I. W. Boyd in *Photochemical Processing of Electronic Materials* (Academic Press, New York), pp.387-429
 42. K. L. Saenger: "Bibliography of films deposited by pulsed laser deposition" in *Pulsed Laser Deposition of Thin Films* (Wiley, New York 1994), pp. 581-613
 43. H. M. Smith, A. F. Turner: Appl. Opt. 4, 147 (1965)
 44. N. Matsumoto, H. Shima, T. Fujii, F. Kannari: Appl. Phys. Lett. 71, 2469 (1997)
 45. E. Ina, N. Matsumoto, E. Shikada, F. Kannari: Appl. Surf. Sci. 129, 574 (1998)

-
46. J. Salih, J. M. Marshall, J. M. Maud: *J. Non-Cryst. Solids* 230, 1240 (1998)
 47. R. W. Nelson, R. M. Thomas, P. Williams: *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 4, 348 (1990)
 48. R. S. Phadke, G. Agarwal: *Mater. Sci. Eng. C* 5, 237 (1998)
 49. G. Agarwal, R. S. Phadke: *Mater. Sci. Eng. C* 6, 13 (1998)
 50. Y. Tsuboi, M. Goto, A. Itaya: *Chem. Lett.* 6, 521 (1998)
 51. Y. Tsuboi, M. Goto, A. Itaya: *J. Appl. Phys.* 89, 7917 (2001)
 52. A. PiqueÂ, R.A. McGill, D.B. Chrisey, D. Leonhardt, T.E. Mslna, B.J. Spargo, J.H. Callahan, R.W. Vachet, R. Chung, M.A. Bucaro: *Thin Solid Films* 355-356, 536 (1999)
 53. R.Cristescu, I.Stamatin, D.E.Mihaiescu, C.Ghica, M.Albulescu, I.N.Mihailescu, D.B. Chrisey: *Thin Solid Films* 453 –454, 262 (2004)
 54. S.L. Johnson, H.K. Park, R.F. Haglund Jr,: *Appl. Surf. Sci.* 253, 6430 (2007)
 55. B. Toftmann, K. Rodrigo, J. Schou, R. Pedrys: *Appl. Surf. Sci.* 247, 211 (2005)
 56. A. Purice, J. Schou, P. Kingshott, N. Pryds, M. Dinescu: *Appl. Surf. Sci.* 253, 6451 (2007)
 57. J. Bohandy, B.F. Kim and F.J. Adrian: *J. Appl. Phys.* 60, 1538 (1986)
 58. F.J. Adrian, J. Bohandy, B.F. Kim, A.N. Jette and P. Thompson: *J. Vac. Sci. Technol. B* 5, 1490 (1987)
 59. Z. Tóth, B. Hopp, Z. Kántor, F. Ignácz, T. Szörényi, Z. Bor: *Appl. Phys. A* 60, 431 (1995)
 60. Z. Kántor, Z. Tóth, T. Szörényi, A.L. Tóth: *Appl. Phys. Lett.* 64, 3506 (1994)
 61. V. Schultze, M. Wagner: *Appl. Phys. A* 53, 241 (1991)
 62. I. Zergioti, S. Mailis, N.A. Vainos, P. Papakonstantinou, C. Kalpouzos, C.P. Grigoropoulos, C. Fotakis: *Appl. Phys. A* 66, 579 (1998)
 63. P. Mogyorósi, T. Szörényi, K. Bali, Z. Tóth, I. Hevesi: *Appl. Surf. Sci.* 36, 157 (1989)
 64. Z. Kántor, Z. Tóth, T. Szörényi: *Appl. Phys. A* 54, 170 (1992)
 65. E. Fogarassy: *Proc. SPIE* 1394, 169 (1990)

-
66. M. Colina, P. Serra, J.M. Fernandez-Pradas, L. Sevilla, J.L. Morenza: *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1638 (2005)
67. I. Zergioti, A. Karaïskou, D.G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki and D. Kafetzopoulos, *Appl. Surf. Sci.* 247, 584 (2005)
68. Y. Tsuboi, Y. Furuhashi, N. Kitamura: *Appl. Surf. Sci.* Doi: 10.1016/j.apsusc.2007.04.013
69. B.R. Ringeisen, D.B. Chrisey, A. Pique, H.D. Young, R. Modi, M. Bucaro, J. Jones-Meehan, B.J. Spargo: *Biomaterials* 23, 161 (2002)
70. P. K. Wu, B. R. Ringeisen, J. Callahan, M. Brooks, D. M. Bubb, H. D. Wu, A. Piqué, B. Spargo, R. A. McGill and D. B. Chrisey: *Thin Solid Films* 398-399, 607 (2001)
71. B.R. Ringeisen, H. Kim, J.A. Barron, D.B. Krizman, D.B. Chrisey, S. Jackman, R.Y.C. Auyeung and B.J. Spargo: *Tissue Engineering* 10, 483 (2004)
72. <http://www.teflonuzem.hu/main.php?main=techno>
73. http://www.boedeker.com/teflon_p.htm
74. Hougham, G.G.; Cassidy, P.E.; Johns, K.; Davidson, T. (Eds.): *Fluoropolymers 1: Synthesis, and Fluoropolymers 2: Properties*, 1999, 338 p., ISBN: 978-0-306-46060-9
75. R.E. Banks, B.E. Smart, J.C. Tatlow: *Organofluorine chemistry*; Plenum Press, New York, 1994.
76. http://www2.dupont.com/Teflon_Industrial/en_US/tech_info/techinfo_compare.html
77. M. Okoshi, M. Murahara, K. Toyoda: *J. Matter. Res.* 7, 1912 (1992)
78. H. Niino, A. Yabe: *Appl. Phys. Lett.* 63, 3527 (1993)
79. K. Révész, B. Hopp, Zs. Bor: *Appl. Surf. Sci.* 109/110, 222 (1997)
80. K. Révész, B. Hopp, Zs. Bor: *Langmuir* 13, 5593 (1997)
81. B. Hopp, Zs. Geretovszky, I. Bertóti and I. W. Boyd: *Appl. Surf. Sci.* 186, 80 (2002)
82. B. Hopp, N. Kresz, J. Kokavecz, T. Smausz, H. Schieferdecker, A. Döring, O. Marti, Z. Bor: *Appl. Surf. Sci.* 221 (1-4): 437 (2004)
83. S. Küper, M. Stuke: *Appl. Phys. Lett.* 54, 4 (1989)
84. K. Seki, H. Tanaka, T. Ohta, Y. Aoki, A. Imamura, H. Fujimoto, H. Yamamoto, H. Inokuchi: *Phys. Scripta* 41 (1990)
85. T. Nakata, F. Kannari, M. Obara: *Optoelektronics* 8, (1993)
86. S. Wada, H. Tashiro, K. Toyoda, H. Niino, A. Yabe: *Appl. Phys. Lett.* 62, 211 (1993)

-
87. J. T. Dickinson, Shin Jaw-Jung, W. Jiang and M. G. Norton, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 91, 672 (1994)
88. Kiran P. Adhi, Roger L. Owings, Tarak A. Railkar, W. D. Brown and A. P. Malshe: Appl. Surf. Sci. 218, 17 (2003)
89. R. Schwödiauer, J. Heitz, E. Arenholz, S. Bauer-Gogonea, S. Bauer, W. Wirges: J. Pol. Sci. B 37, 2115 (1999)
90. S. T. Li, E. Arenholz, J. Heitz and D. Bäuerle: Appl. Surf. Sci. 125, 17 (1998)
91. N. Huber, J. Heitz, D. Bauerle: Eur. Phys. J.-Appl. Phys. 29 (3), 231 (2005)
92. N. Huber, J. Heitz, D. Bauerle: Eur. Phys. J.-Appl. Phys. 25 (1), 33 (2004)
93. M. G. Norton, W. Jiang, J. T. Dickinson and K. W. Hipps: Appl. Surf. Sci. 96–98, 617 (1996)
94. G. B. Blanchet: Appl. Phys. Lett. 62, 479 (1993)
95. G. B. Blanchet and C. R. Fincher Jr: Adv. Matter. 6, 881 (1994)
96. <http://www.mfk.unideb.hu/~vegyesz/ildi/biopolimerek/bpea0607-1.pdf>
97. <http://www.kfki.hu/chemonet/osztaly/eloadas/bdp.html> - Pukánszky Béla: Biológiaiilag lebontható csomagolóanyagok (BDP) A Kémiai Tudományok Osztálya 2000. február 15-i ülésén elhangzott előadás vázlata
98. http://www.worldscibooks.com/engineering/etextbook/p311/p311_chap1.pdf
99. http://adattar.atestor.hu:81/avl/cikkek/04_2_63-65_olah.pdf (Oláh László: Az implantátumok anyagainak polimertechnikai vonatkozásai)
100. *Vegyészeti Lexikon*, O. Neumüller, A. Römpf, Műszaki Könyvkiadó Budapest, 1983 3. kötet, 658-659
101. http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/walter/asp/represent_asite.jpg
102. <http://xray.biochem.ualberta.ca/~maia/#pdb1psn>
103. *Élelmiszer kémia*, Gasztonyi K., Lásztity R., Mezőgazda kiadó 1992, 1. kötet 565.
104. <http://www.reanal.hu/downloads/uploads/info/hu/3616529980.pdf> (KARBAMID *in vitro* DIAGNOSZTIKAI REAGENS KÉSZLET Kétpontos UV módszer)
105. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Helicobacter/H-140-PI-hu.pdf>
106. <http://www.sci.u-szeged.hu/zoolcell/sbea/04/04.htm>
107. <http://hmika.freeweb.hu/Lexikon/Html/AlginSav.htm>
108. <http://www.naturtanya.hu/termekbo.php?id=226>

-
109. Maushagen-Schnaas, Ellen: Az allergia okai, megelőzése és kezelése : [az egészségről mindenkinek] / Ellen Maushagen-Schnaas, Werner Waldmann ; [ford. Vámos Katalin]
110. Gyakorlati allergológia / Szerk. Szemere Pál, Nékám Kristóf, Bp.; Berlin : Springer, 1996
111. Dr. Nyirkos Péter: Nem mind arany.../A fémallergiáról, :
www.vital.hu/themes/allerg3.htm
112. V. D. M. Stejskal, A. Danersund, A. Lindwall, R. Hudecek, V. Nordman, A. Yaqob, W. Mayer, W. Bieger, M. Lindh: *Neuroendocrinology Letters* ISSN 0172-780X pp 289, (1999)
113. N. J. Hallab, K. Mikecz, J. J. Jacobs: *J. Biomed. Mat. Res.*, 53 (5), 480, (2000)
114. M. Hindsen: *Acta Derm. Venereol.*, 5-22, Suppl. 204, (1999)
115. T. Smausz, N. Kresz, B. Hopp, *Appl. Surf. Sci* Vol 177/1-2, 66-72, (2001)
116. Schrader, Bernhard 1989 *Raman/Infrared Atlas of Organic Compounds* (Weinheim, Wiley-VCH) p. N-08
117. T. Smausz, B. Hopp, N. Kresz: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 35, 1859 (2002)
118. N. Kresz, J. Kokavecz, T. Smausz, B. Hopp, M. Csete, S. Hild, O. Marti: *Thin Solid Films*, 453-454, 239 (2004)
119. R. Smajda, Á. Kukovecz, B. Hopp, M. Moh, Z. Kónya, I. Kiricsi, J. Nanosci. Nanotech. 7 (4-5), 1604 (2007)
120. B. Hopp, T. Smausz, P.M. Nagy, A. Juhász, F. Ignác, Z. Márton: *Appl. Phys. A* 76, 731 (2003)
121. B. Hopp, N. Kresz, J. Kokavecz, T. Smausz, H. Schieferdecker, A. Döring, O. Marti, Z. Bor, *Appl. Surf. Sci.* 221 (1-4): 437-443 JAN 15 (2004)
122. G. Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies* (J. Wiley and Sons, Chichester), 1980, p. 68-71
123. G. Kecskeméti, T. Smausz, N. Kresz, Zs. Tóth, B. Hopp, D. Chrisey and O. Berkesi: *Appl. Surf. Sci.*, 253, 1185 (2006)
124. G. Kecskeméti, N. Kresz, T. Smausz, B. Hopp, A. Nógrádi: *Appl. Surf. Sci.* 247, 83 (2005)
125. T. Smausz, G. Megyeri, R. Kékesi, Cs. Vass, B. Hopp, E. György, I.N. Mihailescu, Conference on Laser Ablation (COLA07), Teneriffé, Spanyolország, 2007
126. D.B. Chrisey, A. Pique', R.A. McGill, J.S. Horwitz, B.R. Ringeisen: *Chem. Rev.* 103, 553 (2003)

-
127. E. György, F. Sima, I. N. Mihailescu, T. Smausz, B. Hopp, D. Predoi, S. Ciuca, L. E. Zdrentu, S. Petrescu, közlésre elfogadva az Appl. Surf. Sci.-be
 128. E. György, F. Sima, I. N. Mihailescu, T. Smausz, G. Megyeri, R. Kékesi, B. Hopp, L. Zdrentu, S. M. Petrescu, közlésre elfogadva a Journal of Biomedical Materials Research-be
 129. *Fogászat*, Dr. Tóth Károly (szerk.), Medicina Könyvkiadó 1981
 130. M. Bereznai, I. Pelsöczy, Z. Tóth, K. Turzó, M. Radnai, Z. Bor, A. Fazekas: Biomaterials 24, 4197 (2003)
 131. D. Buser, R. K. Schenk, S. Steinmann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox, H. Stich: J. Biomed. Mater. Res. 25, 889 (1991)
 132. A. Wennerberg, T. Ektessabi, L. Albrektsson, B. Johansson, B. Andersson: Int. J. Oral Max. Implants 12, 486 (1997)
 133. F. Grizon, E. Aguado, G. Hure, M.F. Basle, D. Chappard: Journal of Dentistry 30, 195 (2002)
 134. M. Shirkhanzaeh: J. Mater. Sci. Mater. Med. 6, 206 (1995)
 135. T. Yuhta, Y. Kikuta, Y. Mitamura: J. Biomed. Mater. Res. 28, 217 (1994)
 136. M. Amon, A. Bolz, M. Schaldach: J. Mater. Sci. Mater. Med. 7, 273 (1996)
 137. Braceras, J. I. Alava, J. I. Onate, M. Brizuela, A. Garcia-Luis, N. Garagorri, J. L. Viviente, M. A. de Maeztu: Surf. and Coat. Tech. 158-159, 28 (2002)
 138. M. Cotell, D. B. Chrisey, K. S. Grabowski, J. A. Spregue: J. Appl. Biomat. 3, 87 (1992)
 139. V. Salih, G. Georgiou, J. C. Knowles, I. Olsen: Biomaterials 22, 2817 (2001)
 140. T. M. Sridhar, U. Kamachi Mudali, M. Subbaiyan: Corros. Sci. 45, 237 (2003)
 141. M. Hamdi, A. M. Ektessabi: Thin Solid Films 398–399, 385 (2001)
 142. H. Baumann, K. Bethge, G. Bilger, D. Jones, I. Symietz: Nucl. Instr. and Meth. B 196, 286 (2002)
 143. D. G. A. Nelson, J. D. B. Featherstone: Calcif. Tiss. Int. 34, 69 (1982)
 144. B. Mayor, J. Arias, S. Chiussi, F. Garcia, J. Pou, B. Leon Fong, M. Perez-Amor: Thin Solid Films 317, 363 (1998)
 145. TopoMetrix User's Manual, Version 3.04

-
146. T. Smausz, B. Hopp, H. Huszár, Z. Tóth, G. Kecskeméti: *Appl. Phys. A* 79, 1101 (2004)
147. L. D'Alessio, A. De Bonis, A. Galasso, A. Morone, A. Santagata, R. Teghil, P. Villani, M. Zaccagnino, *Appl. Surf. Sci.*, 248, 295–298 (2005)
148. R. Teghil, L. D'Alessio, A. De Bonis, A. Galasso, P. Villani, M. Zaccagnino, A. Santagata, D. Ferro, *Appl. Surf. Sci.*, 247, 51–56 (2005)
149. G. Kister, G. Cassanas, M. Vert: *Spectrochim. Acta A*, 53 1399 (1997)
150. B. Hopp, T. Smausz, G. Kecskeméti, A. Klini and Zs. Bor: *Appl. Surf. Sci.*, 253 7806 (2007)
151. A. Nógrádi, B. Hopp, T. Smausz, Zs. Bor, L. Kolozsvári, A. Szabó, G. Kecskeméti, A. Klini, elfogadva a *Tissue Engineering*-be
152. M.J. Mahoney and K.S. Anseth: *Biomaterials*, 27, 2265 (2006)
153. J. Zoldan and S. Levenberg: *Methods in Enzymology*, 420, 381 (2006)
154. B. Wolf, M. Kraus, M. Brischwein: *Bioelectrochem. Bioenergy* 46 215 (1998)
155. L. Bousse, *Sens. Actuators B* 34, 270 (1996)
156. W.H. Baumann, M. Lehmann, A. Schwinde, A. Schwinde, R. Ehret, M. Brischwein and B. Wolf: *Sens. Actuators B* 55, 77 (1999)
157. Y.C. Wu, P. Wang, X.S. Ye, Z. Gaoyan, H. Huiqi, Y. Weimin, Z. Xiaoxiang, H. Jinghong and C. Dafu: *Sens. Actuators B* 80 215 (2001)
158. G.H. Markx, J.S. Andrews and V.P. Mason: *Trends in Biotechnology*, 22, 417 (2004)
159. T. Boland, X. Tao, B.J. Damon, B. Manley, P. Kesari, S. Jalota and S. Bhaduri: *Mat. Sci. and Engin.* 27, 372 (2007)
160. A. Kobayashi, H. Miyake, H. Hattori, R. Kuwana, Y. Hiruma, K. Nakahama, S. Ichinose, M. Ota, M. Nakamura, S. Takeda: *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 358, 692 (2007)
161. T. Xu, C.A. Gregory, P. Molnár, X. Cui, S. Jalota, S.B. Bhaduri and T. Boland: *Biomaterials*, 27, 3580 (2006)
162. G.I. Murray: *Acta Histochemica*, 109, 171 (2007)
163. K. Kinnecom and J.S. Pachter: *Brain Research Protocols*, 16, 1 (2005)

-
164. J.A. Barron, B.R. Ringeisen, H. Kim, B.J. Spargo and D.B. Chrisey: Thin Solid Films, 453, 383 (2004)
165. W. A. Tolbert, I-Yin S. Lee, D. D. Dlott, M. M. Doxtader, and W. Ellis: J. Imaging Sci. Technol. 37, 411 (1993).
166. D. Klein and D. E. Eveleigh, in Trichoderma and Gliocladium, edited by C. P. Kubicek and G. E. Harman (Taylor and Francis, London, 1998), Vol. 1, pp. 57–74.
167. L. Manczinger, Z. Antal, and L. Kredics: Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49, 1 (2002).
168. Z. Antal, L. Manczinger, G. Szakács, R. P. Tengerdy, and L. Ferenczy: Mycol. Res. 104, 545 (2000)
169. L. Kredics, Z. Antal, I. Doczi, L. Manczinger, F. Kevei, and E. Nagy: Acta Microbiol. Immunol. Hung. 50, 105 (2003)
170. B. Hopp, T. Smausz, Zs. Antal, N. Kresz, Zs. Bor, D. Chrisey: J. Appl. Phys. 96, 3478 (2004)
171. Antal Zs., Hopp B., Smausz T., Kresz N., Bor Zs., Douglas C.: „Egy Trichoderma törzs konídiumainak irányított, lézeres, térbeli mozgása”, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése, Keszthely, Előadás kivonatok 1-2. (2004)
172. V. J. Zaleckas and H. C. Koo: Appl. Phys. Lett. 31, 615 (1977)
173. V. P. Veiko, A. I. Kaidanov, H. A. Kovachki, and E. A. Shakhno: Proc. SPIE 1723, 63 (1991).
174. B. Hopp, T. Smausz, N. Kresz, N. Barna, Zs. Bor, L. Kolozsvári, D.B. Chrisey, A. Szabó and A. Nógrádi: Tissue Engineering 11, 1817 (2005)
175. Hopp Béla, Smausz Tamás, Kresz Norbert, Barna Norbert, Bor Zsolt, Kolozsvári Lajos, Douglas B. Chrisey, Szabó András, Nógrádi Antal: „Különböző élő sejtek túlélési és proliferációs képességei lézeres sejtmásolás után / *Survival and proliferation ability of different types of living cell after laser-induced forward transfer*”; A Magyar Szemorvostársaság 2005. évi Kongresszusa Annual Congress of the Hungarian Ophthalmological Society 2005
176. B Hopp, T Smausz, N Barna, Cs Vass, Zs Antal, L Kredics and D Chrisey: J. Phys. D: Appl. Phys. 38, 833 (2005)

-
177. R.M.E. Mastrapa, H. Glanzberg, J.N. Head, H.J. Melosh and W.L. Nicholson: *Earth Planet. Sci. Lett.* 189, 1 (2001)
178. G. Horneck, D. Stöffler, U. Eschweiler and U. Hornemann: *Icarus* 149, 285 (2001)
179. C. Mileikowsky, E. Larsson and B. Eiderfors: *Proc. Gen. Assoc. EGS* 19 (1999)
180. M.J. Burchell, J.R. Mann and A.W. Bunch, Pedro F. B. Brandão: *Icarus*, 154, 545 (2001)
181. L. Kolozsvári, A. Nógrádi, B. Hopp, Z. Bor, *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 43 (7): 2165-2168 JUL (2002)
182. J. Wang, H. Niino, and A. Yabe: *Appl. Surf. Sci.* 154–155, 571 (2000)
183. Cs. Vass, T. Smausz, and B. Hopp: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 37, 2449 (2004)
184. G. Kopitkovas, T. Lippert, C. David, A. Wokaun and J. Gobrecht, *Microelectronic Engineering*, 67-68, 438 (2003)
185. H. Niino, Y. Yasui, X. Ding, A. Narazaki, T. Sato, Y. Kawaguchi, and A. Yabe, *J. Photoch. Photobio. A: Chemistry* 158, 179 (2003)
186. Cs. Vass, D. Sebők, B. Hopp, *Applied Surface Science*, Volume 252, 4768 (2006)
187. R. Böhme and K. Zimmer: *Appl. Surf. Sci.* 247, 256 (2005)
188. Y. Kawaguchi, X. Ding, A. Narazaki, T. Sato, and H. Niino: *Appl. Phys. A* 79, 883 (2004)
189. R. Böhme, D. Spemann, and K. Zimmer: *Thin Solid Films* 453–454, 127 (2004)
190. G.Kopitkovas, T.Lippert, C.David, A.Wokaun, and J.Gobrecht: *Thin Solid Films* 453–454, 31 (2004)
191. R. Böhme, and K. Zimmer: *Appl. Phys. A* 83, 9 (2006)
192. Cs. Vass , B. Hopp , T. Smausz and F. Ignácz: *Thin Solid Films*, 453-454, 121 (2004)
193. B. Hopp, Cs. Vass and T. Smausz: *Appl. Surf. Sci.*, 253, 7922 (2007)
194. B. Hopp, Cs. Vass, T. Smausz and Zs. Bor: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39, 4843 (2006)
195. T. Csizmadia, T. Smausz, N. Kresz and B. Hopp: közlésre elfogadva az *Appl. Surf. Sci.*-be
196. B. Hopp, T. Smausz, M. Bereznai: *Appl. Phys. A* 87, 77 (2007)

197. Cs. Vass, D. Sebők, B. Hopp, Applied Surface Science, Volume 252, Issue 13, 30 April, Pages 4768-4772 (2006)
198. ELJÁRÁS ÁTLÁTSZÓ ANYAG KÖZVETETT IMPULZUSLÉZERES MEGMUNKÁLÁSÁRA, P0600443 a.sz. magyar, USA és Japán szabadalmi bejelentés